

Janne Wallenius

***Lactobacillus rhamnosus* GG:n  
geeniekspressiovasteet  
kasvu ympäristön pH:n vaihteluun**

**Elektroniikan, tietoliikenteen ja automaation tiedekunta**

Diplomityö, joka on jätetty opinnäytteenä tarkastettavaksi  
diplomi-insinöörin tutkintoa varten Espoossa 23.4.2010.

**Työn valvoja:**

Prof. Matti Leisola

**Työn ohjaajat:**

TkT Tero Eerikäinen

TkT Juha-Pekka Pitkänen



**Aalto-yliopisto**  
Teknillinen korkeakoulu

Tekijä: Janne Wallenius

Työn nimi: *Lactobacillus rhamnosus* GG:n geeniekspressiovasteet  
kasvu ympäristön pH:n vaihteluun

Päivämäärä: 23.4.2010

Kieli: Suomi

Sivumäärä: 8+102

Elektroniikan, tietoliikenteen ja automaation tiedekunta

Professuuri: Bioprosessitekniikka

Koodi: KE-70

Valvoja: Prof. Matti Leisola

Ohjaajat: TkT Tero Eerikäinen, TkT Juha-Pekka Pitkänen

Monitoroimalla organismin geeniekspressiota voidaan saada hyödyllistä informaatiota fysiologiasta bioprosessikasvatuksen eri vaiheissa. Tässä työssä on tutkittu kirjallisuudessa aiemmin mainittujen pH-stressiin liittyvien geenien *atpA*, *aldB*, *cfa*, *groEL*, *hrcA* ja *pstS* ekspressoitumista suhteellisen geeniekspression menetelmällä käyttäen vertailugeeninä *ldhD*:tä. Ekspressiomittaukset tehtiin käyttäen qPCR- ja TRAC-menetelmää. Tutkittuna organismina oli probioottina tunnettu *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG). Teollisen kasvatuksen pH:n säädössä esiintyviä emäsgradientteja sekä lämpötilagradientteja simuloitiin scale-down-menetelmällä. Lisäksi tutkittiin laboratorioravintoalustan ja teollisen ravintoalustan välisiä eroja panoskasvatuksilla.

Scale-down-kokeissa havaittiin geenien *groEL*, *hrcA* ja *atpA* antavan vasteita lämpötilan ja pH:n muutoksiin. *pstS*-geenin ekspressio kasvoi lähes lineaarisesti kemostaattikokeissa tulppavirtausreaktoriin aiheutetun emäsgradientin kasvaessa. Työssä tutkittujen geenien ekspressioiden yksittäiset korrelaatiot kemostaattikokeiden näytteille tehtyjen happostressi- ja pakastussäilyvyyksien välillä olivat vähäisiä. Panoskasvatuksista tehtyjen geeniekspressiomittausten perusteella erilaisilla kasvualustoilla näyttäisi olevan vaikutusta tutkittujen geenien ekspressioon. Teollisella alustalla ekspressioiden suhteelliset muutokset eri kasvuvaiheiden välillä olivat pienempiä, mutta vertailugeeniin verratut ekspressiot olivat pääsääntöisesti suurempia kuin laboratorioalustalla.

Avainsanat: Geeniekspressio, pH, *Lactobacillus rhamnosus* GG, qPCR, TRAC, *atpA*, *aldB*, *cfa*, *groEL*, *hrcA*, *pstS*, *ldhD*

Author: Janne Wallenius

Title: Gene expression responses of *Lactobacillus rhamnosus* GG to pH changes of the growth environment

Date: 23.4.2010

Language: Finnish

Number of pages: 8+102

Faculty of Electronics, Communications and Automation

Professorship: Bioprocess Engineering

Code: KE-70

Supervisor: Prof. Matti Leisola

Instructors: D.Sc.(Tech.) Tero Eerikäinen, D.Sc.(Tech.) Juha-Pekka Pitkänen

Monitoring organism's gene expression can provide useful information on its physiology in different phases of cultivation. In this work expression of pH stress related genes found from the literature (*atpA*, *aldB*, *cfa*, *groEL*, *hrcA* and *pstS*) were studied as a relative gene expression study using *ldhD* as a reference gene. Expression measurements were carried out using qPCR and TRAC methods. Study organism was *Lactobacillus rhamnosus* GG, a renowned probiotic. Base gradients caused by pH control in an industrial process and temperature gradients were simulated with a scale-down method. A pH gradient was created in a plug flow reactor. Furthermore, differences between laboratory cultivation medium and industrial cultivation medium were studied with batch cultivations. In these cultivations the set point of pH control was oscillated.

In the scale-down experiments the responses of *groEL*, *hrcA* and *atpA* genes to temperature and pH changes were studied. The expression of *pstS* gene was induced almost linearly in the chemostat cultivation experiments when base gradient in plug flow reactor was increased. There was rather low correlations between the expressions of studied genes and surviving from acid stress test or freeze stability test, which were carried out from the samples of the chemostat cultivation experiments. Based on gene expression measurements from the batch cultivations it seems that the type of the cultivation medium affects expressions of the studied genes. In case of the industrial cultivation medium relative changes in gene expressions were less between different growth phases but expressions related to the reference gene were mainly higher compared to the laboratory medium.

Keywords: Gene expression, pH, *Lactobacillus rhamnosus* GG, qPCR, TRAC, *atpA*, *aldB*, *cfa*, *groEL*, *hrcA*, *pstS*, *ldhD*

# Esipuhe

Tämä diplomityö on tehty osana BioControl-projektia Aalto-yliopiston Teknillisen korkeakoulun Bioprosessitekniikan laboratoriossa 1.5.2009–23.4.2010.

Monet ihmiset ansaitsevat kiitoksen tämän työn toteutumisesta. Ensinnäkin haluan kiittää Tuomas Uuksulaista onnistuneesta yhteistyöstä. Kiitän Tero Eerikäistä ohjauksesta ja mahdollisuuden tarjoamisesta. Kiitoksia valvojalleni, professori Matti Leisolalle, lopullisista korjaus ehdotuksista. Kiitoksia Noora Saloselle neuvoista molekyylibiologian töissä, Kalle Saloselle avusta kasvatusten koejärjestelyjen suunnittelussa, Svetlana Zakharovalle perehdyttämisestä qPCR:n käyttöön, Johanna Auralle opastuksesta laboratoriotöissä, J-P Pitkäselle avustuksesta soluhajotusten kanssa, Jari Rautiolle TRAC-yhteistyöstä, Matti Kankaiselle geenisekvenssien tarjoamisesta, Markus Räsäselä avustuksesta näytteenotossa ja tekstin siistimisestä, Dorothee Barthille ja Anniina Jaakkoselle kuvien ja tekstin kritiikistä. Kiitokset vanhemmilleni ja läheisilleni tuesta.

Otaniemi, 7.5.2010

Janne Wallenius

# Sisältö

Tiivistelmä	ii
Tiivistelmä (englanniksi)	iii
Esipuhe	iv
Sisällysluettelo	v
1 Lyhenteet	viii
2 Johdanto	1
<b>I Kirjallisuusosa</b>	<b>3</b>
3 Maitohappobakteerit	4
4 Molekyylibiologinen tausta	4
5 Geeniekspressio pH:n vaihtelun biomarkkerina	7
6 Haponsietokyky	8
7 pH:n stressivastegeenit	11
7.1 Lämpöshokkigeenit . . . . .	11
7.2 Lämpöshokin transkription säätely, <i>HrcA</i> . . . . .	13
7.3 F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPaasi . . . . .	15
7.4 Lipidikalvon muutokset . . . . .	16
7.5 Asetoiinin muodostus . . . . .	18
7.6 Fosfaattispesifien ABC-transportterien ekspressoituminen korkeassa pH:ssa . . . . .	19
8 qPCR-menetelmä	20
8.1 qPCR:n fluoresointimenetelmät . . . . .	21
8.2 qPCR:n kvantitatiivinen analyysi . . . . .	23
9 TRAC-menetelmä	24

<b>II</b>	<b>Kokeellinen osa</b>	<b>26</b>
<b>10</b>	<b>Tutkimuksen tavoite ja rakenne</b>	<b>27</b>
<b>11</b>	<b>Tutkimusaineisto ja -menetelmät</b>	<b>27</b>
11.1	Bakteerikanta ja ravintoalustat . . . . .	27
11.2	Panoskasvatukset . . . . .	27
11.3	Scale-down-kasvatus . . . . .	28
11.4	Hapostressikoe scale-down-kasvatuksesta . . . . .	29
11.5	Näytteenotto . . . . .	30
11.6	RNA:n eristys . . . . .	30
11.7	DNaasi-käsittely . . . . .	31
11.8	Käänteistranskriptio . . . . .	31
11.9	Tutkittavat geenit . . . . .	32
11.10	Geeniekspressiotasojen määritykset qPCR:llä . . . . .	32
11.10.1	Alukkeiden suunnittelu qPCR:lle . . . . .	32
11.10.2	qPCR-ajojen toteutus ja lämmitysprotokolla . . . . .	33
11.10.3	qPCR-datan käsittely . . . . .	34
11.11	Geeniekspressiotasojen määritykset TRAC:illa . . . . .	35
11.11.1	TRAC:in laadunvarmistus . . . . .	37
11.12	Datan jälkianalyysi . . . . .	37
<b>12</b>	<b>Tulokset ja tulosten tarkastelu</b>	<b>40</b>
12.1	RNA:n käsittely qPCR:ää varten . . . . .	40
12.2	TRAC- ja qPCR-tulosten vertailu . . . . .	40
12.3	Panoskasvatusten geeniekspressiot . . . . .	44
12.4	Scale-down-kokeiden geeniekspressiot . . . . .	49
12.5	Hapostressikokeen geeniekspressiot . . . . .	51
12.6	Scale-down-kokeiden geeniekspressioiden data-analyysi . . . . .	52
<b>13</b>	<b>Yhteenveto</b>	<b>60</b>
<b>14</b>	<b>Jatkotutkimusehdotuksia</b>	<b>61</b>
	<b>Viitteet</b>	<b>62</b>

<b>III</b>	<b>Liitteet</b>	<b>73</b>
A	Liite: qPCR:n alukkeiden sulamiskäyräanalyysit	74
B	Liite: qPCR-data	81
C	Liite: Näytteiden totaali-RNA:t	86
D	Liite: TRAC-data	87
E	Liite: Mallien generointi ja niiden $R^2$ - ja $Q^2$ -arvot	89
F	Liite: Mallien tunnusluvut	102

# 1 Lyhenteet

## Symbolit

$C_T$	qPCR:n sykli, jolla näyte ylittää kynnysarvon
$\Delta\Delta C_T$	$C_T$ :n muutos vertailupisteeseen ja housekeeping-geeniin nähden
$\mathbf{y}$	selitettävä muuttuja ( $n \times 1$ -vektori)
$\mathbf{X}$	selittävien muuttujien matriisi ( $n \times p$ -matriisi)
$\beta$	mallin regressiokertoimien ( $p \times 1$ -vektori)
$\varepsilon$	satunnainen mallivirhe ( $n \times 1$ -vektori)
$R^2$	luku, joka kuvaa mallin sovituksen hyvyyttä
$Q^2$	luku, joka kuvaa mallin ennustavuuden hyvyyttä

## Lyhenteet

ATP	adenosiinitrifosfaatti
ATR	adaptiivisena vasteena muodostuva haponsietokyky (engl. acid tolerance response)
cDNA	komplementaarinen DNA
CFA	metyleenioktadekaanihappo
CIRCE	kaperoniekspression säätelevä käänteistoisto (engl. controlling inverted repeat of chaperone expression)
DEPC	dietyylipyrokarbonaatti
dsDNA	kaksijuosteinen DNA (engl. double-stranded DNA)
DTT	ditiotreitoli
LAB	maitohappobakteerit (engl. lactic acid bacteria)
LGG	<i>Lactobacillus rhamnosus GG</i>
NC	qPCR-kontrolli, jossa käytetään templaatti-DNA:n sijaan näytteen RNA:ta (engl. negative control)
NTC	qPCR-kontrolli, jossa ei ole templaatti-DNA:ta (engl. no template control)
PC	qPCR-kontrolli, jossa käytetään templaatti-DNA:na standardi-RNA:sta käänteistranskriptoitua cDNA:ta (engl. positive control)
PCR	polymeraasiketjureaktio (engl. polymerase chain reaction)
SAM	S-adenosyylimetioniini
SDS	natriumlauryylisulfaatti
qPCR	kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (engl. quantitative polymerase chain reaction)



## 2 Johdanto

Bakteereilla on havaittu, että kasvuolosuhteissa esiintyvä kevyt stressi kasvattaa stressin sietokykyä muutoin tappavaa stressiä kohtaan (Corcoran *et al.*, 2008a). Kasvuolosuhteiden pH ja lämpötila voivat olla bakteerille stressaavia tekijöitä. Näitä on myös helppo säätää bioprosessissa. Tässä työssä on käytetty tutkimusorganismina teollisesti tunnettua probioottia *Lb. rhamnosus* GG:tä (LGG). Teollisuuden tuotteena probiootti joutuu kohtaamaan elinkaarensa aikana monia pH:n muutokseen liittyviä stressejä. Prosessin pH:ta säädettäessä reaktoriin muodostuu emäsgradientteja. Lisäksi probiootin tapauksessa varastointi voi tapahtua happamuudeltaan stressaavassa ympäristössä, kuten piimässä tai mehussa, ja lopulta mahaneste asettaa probiootille happamuudeltaan haastavimman stressin (Marteau *et al.*, 1997). Parantamalla probiootin stressin sietokykyä lopputuotteen laatu voisi parantua.

Bioprosesseja monitoroidaan pääasiassa solun ulkoisiin kemiallisiin tai fysikaalisiin muuttujiin perustuen. Näistä havainnoista voidaan tehdä ainoastaan epäsuoria johtopäätöksiä organismin fysiologisesta tilasta. Biomarkkereina toimivat geenit, joiden ekspressiolla on yhteys solun käyttäytymiseen, voivat antaa suoraa informaatiota bioprosessin tilasta. Stressin sietokyvystä informaatiota antavaa geeniä voitaisiin käyttää lopputuotteen laatumuuttujana seuraamalla sen ekspressiota.

Tutkimuksen kirjallinen osuus sisältää selvityksen aiemmasta tutkimuksesta LGG:n kaltaisten mikrobien vasteista pH-stressiin. Kirjallinen osuus käsittelee pH-stressin geeniekspressiovasteita yleisellä tasolla, koska LGG on teollinen kanta ja siitä on vain vähän geeniekspressiovasteisiin liittyviä julkaisuja. Yleisesti tämän aiheen tutkimuksessa on käytetty malliorganismina *Escherichia coli*- ja *Bacillus subtilis*-bakteereja tai muita maitohappobakteerilajeja. Kirjallisessa osuudessa selvitetään myös geeniekspression tutkimisessa käytettyjen TRAC:in ja qPCR:n peruseräatteen.

Tämä työ liittyy kokeelliselta osuudeltaan koesarjaan, jossa kasvatettiin LGG:tä sekä panoskasvatuksena että kemostaatissa. Panoskasvatuksissa säädettiin kasvuympäristön pH muuttumaan optimi-pH:n ympärillä kasvatuksen aikana oskilloinnin omaisesti. Kemostaattikasvatuksissa simuloitiin tulppavirtausreaktorin avulla ns. scale-down-menetelmällä teollisen mittakaavan prosessin pH-säädöstä aiheutuvaa emäsgradienttia. Näihin kasvatuksiin on jatkossa viitattu scale-down-kokeilla tai -kasvatuksilla. Scale-down-kasvatuksessa on tutkittu myös lämpötilavaihtelun vaikutusta asettamalla tulppavirtausreaktori eri lämpötilaan kuin kemostaatti. Kasvatuksissa tehdyt metodologiset valinnat ja toteutustavat on käsitelty laajemmin Uusulaisen (2010) diplomityössä, jossa on myös raportoitu kasvatuksiin liittyvät analyysit pakkaskestävyys- ja happostressikokeista, solutiheydestä, solukuivapainosta, solupitoisuudesta maljauksella sekä käymiskelpoisten sokerien ja solujen tuottamien metaboliittien pitoisuuksista.

Työn tavoitteet olivat monitahoiset. Yhtenä tavoitteena oli selvittää kasvatusolosuhteiden muutoksen vaikutusta kirjallisuuden perusteella valittujen LGG:n koh-

degeenien ekspressioon. Lisäksi tavoitteena oli selvittää näiden geenien ekspresion suhdetta pakkakestävyteen ja haponsietokykyyn sekä vertailla kahta eri menetelmää, TRAC:ia ja qPCR:ää, ekspression mittaukseen.

Työ rajattiin siten, että tutkittavaksi geneiksi valittiin kirjallisuuden perusteella kuusi ilmiöön liittyvää geeniä sekä vertailugeeni. Työssä tutkittiin suhteellisia geeniekspressiomuutoksia. Kasvatusten osalta pH-muutos rajoitettiin alueeseen, joka on realistinen teollisen mittakaavan reaktorissa säädön vuoksi esiintyville emäsgradien-teille. Panoskasvatusten osalta otanta oli pieni, mikä mahdollisti lähinnä vain kasvatusalustojen vertailun.

Osa I

# Kirjallisuusosa

### 3 Maitohappobakteerit

Maitohappobakteerit (engl. lactic acid bacteria; LAB), joihin *Lb. rhamnosus* GG (LGG) kuuluu, ovat ryhmä Gram-positiivisia bakteereita, joita yhdistävät metaboliiset, morfologiset ja fysiologiset piirteet (Salminen ja von Wright, 1998). Yleisen määritelmän mukaan maitohappobakteereja yhdistää genomien alhainen GC-pitoisuus (Zhu *et al.*, 2009), ne eivät itiöi, respiroi, ovat sauvamaisia tai kokkeja ja tuottavat pääasiassa fermentoinnin lopputuotteenaan maitohappoa (Salminen ja von Wright, 1998). Maitohappobakteereja käytetään ruoan ja juomien fermentoinnissa, maun muodostuksessa (Urbach, 1995), säilönnässä (Stiles, 1996) sekä funktionaalisten elintarvikkeiden (Hugenholtz *et al.*, 2002), bakteriosiinien (Vuyst ja Leroy, 2007) ja eksopolysakkaridien (Cerning, 1990; Welman ja Maddox, 2003) valmistuksessa. Myös bulkki- ja hienokemikaaleja kuten maitohappoa (Kwon *et al.*, 2001), B-vitamiinia (Burgess *et al.*, 2004), polyoleja (Wisselink *et al.*, 2002) ja harvinaisia sokereita (Helanto, 2009) voidaan valmistaa käyttämällä maitohappobakteereja.

Monilla maitohappobakteereilla on havaittu olevan probioottisia eli myönteisesti terveyteen vaikuttavia ominaisuuksia. Esimerkiksi LGG:n on havaittu lyhentävän rotaviruksen aiheuttamaa ripulia (Guandalini *et al.*, 2000), vahvistavan immuunikykyä (Kaila *et al.*, 1992), auttavan Crohnin taudin hoidossa (Gupta *et al.*, 2000) ja ehkäisevän allergian muodostumista sekä auttavan sen hoidossa (Kalliomäki *et al.*, 2001; Majamaa ja Isolauri, 1997). Taulukossa 1 on esitelty probioottisten maitohappobakteerien toivottavia ominaisuuksia. Monet näistä ominaisuuksista ovat kanta- ja lajiriippuvaisia piirteitä. Kannan tai kasvatusprosessin muokkaamisella voidaan kuitenkin vaikuttaa toivottaviin ominaisuuksiin. Tämän tutkimuksen mielenkiinnon kohteena ovat erityisesti mahdollisuudet vaikuttaa hapon ja säilytyksen kestävyys- sekä erityisesti mahdollisuudet näiden ominaisuuksien laadunvarmistukseen.

Tässä työssä käytetty LGG on teollinen kanta, josta ei löydy kirjallisuudesta kovinkaan paljon julkaistua tietoa liittyen pH-muutoksen aiheuttamaan geeniekspressiovasteeseen, minkä vuoksi kirjallisuusosiossa onkin tarkasteltu fylogeneettisin perustein vasteita yleisemmällä tasolla. Fylogeneettisesti läheisilläkin lajeilla ja jopa kannoilla voi kuitenkin olla huomattaviakin eroja pH-muutokseen sopeutumiseen liittyen. Tästä esimerkkinä kuvasta 1 voi huomata lähellä LGG:tä olevilla bakteereilla saman lajin eri kannan välillä olevan lähes yhden pH-yksikön eron kasvun sallimassa pH-alueessa.

### 4 Molekyylibiologinen tausta

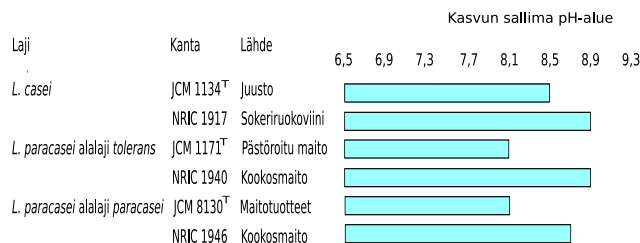
Kaikkien solujen geneettinen informaatio virtaa DNA:sta RNA:ksi ja RNA:sta proteiiniksi (kuva 2). Tätä periaatetta kutsutaan molekyylibiologian keskeiseksi opinkappaleeksi (engl. central dogma). RNA:n synteesiä DNA:sta kutsutaan transkriptioksi ja proteiinin synteesiä RNA:sta kutsutaan translaatioksi. DNA:n geenistä syn-

**Taulukko 1.** Probioottisten maitohappobakteerien toivottavat ominaisuudet (Salminen ja von Wright, 1998)

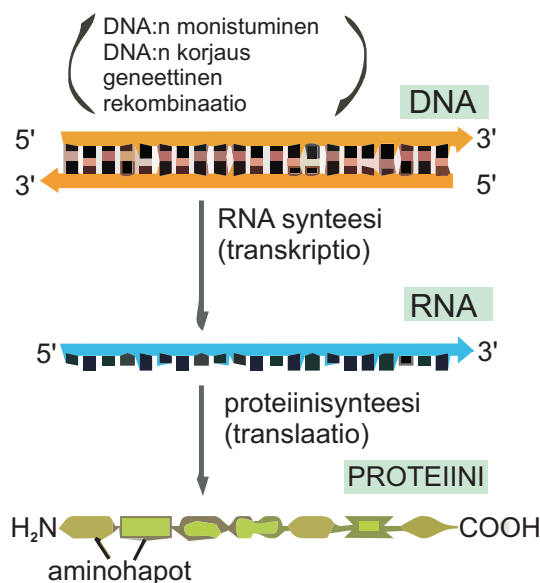
Probioottisen kannan piirteet	Toiminnalliset ja tekniset ominaisuudet
Ihmisalkuperä	Lajiriippuvaiset terveysvaikutukset ja elävyyden ylläpito; soveltuvuus fermentoituihin elintarvikkeisiin
Hapon ja sapen kestävyys	Selviytyminen suolistossa
Kiinnittyminen suoliston soluihin	Kilpaileva patogeenien elintilan rajoittaminen: immuunikyvyn parantaminen
Suolistokanavan kolonisaatio	Lisääntyminen suolistokanavassa ainakin väliaikaisesti, immuunikyvyn parantaminen
Antimikrobisten aineiden tuotto	Suoliston patogeenien inaktivointi, suoliston mikrobiston normalisointi
Kariogeenisten ja patogeenisten bakteerien vastustus	Hampaiden reikiintymisen ja patogeenien kiinnittymisen estäminen
Turvallisuus elintarvikkeissa ja kliinisessä käytössä	Tarkka kannan identifiointi (suku, laji, kanta), dokumentoitu turvallisuus
Kliinisesti varmennetut ja dokumentoidut terveysvaikutukset	Annos-vaste data vaikuttavalle vähimmäismäärälle eri tuotteissa
Säilymis aika ja stabiilius prosessin aikana ja säilytyksessä	Kaikki ylläolevista ominaisuuksista tulisi säilyä prosessin aikana ja säilytyksessä, erityisesti liittymiskyky, antimikrobinen aktiivisuus ja antikarsinogeeniset ominaisuudet

tetisoitua RNA:ta kutsutaan lähetti RNA:ksi (engl. messenger RNA; mRNA). Syntetisoiduilla proteiineilla on usein funktionaalinen tehtävä, minkä vuoksi ajatellaan voitavan saada informaatiota esimerkiksi solun vasteista ympäristön muutokseen mittaamalla synteesiprosessin välituotteiden tai lopputuotteiden määriä (Alberts *et al.*, 2002a).

Prokarioottisolulla geeniekspression säätely tapahtuu monella eri tasolla. Merkittävimpänä säätelypisteenä pidetään transkription aloituksen säätelyä, koska ainoastaan transkription säätely varmistaa ettei solu syntetisoi ylimääräisiä välituottei-



**Kuva 1.** Kasvun sallima maksimiemäksisyys muutamalla fylogeneettisesti LGG:tä lähellä olevalla bakteereilla. Muokattu lähteestä Sawatari ja Yokota (2007).



**Kuva 2.** Reitti DNA:sta proteiiniksi. Muokattu lähteestä Alberts *et al.* (2002a).

ta. Geeniä säätelevät proteiinit voivat säädellä yksittäisten geenien tai geenijoukon transkription pois tai päälle. Prokariooteilla nämä proteiinit liittyvät usein spesifisesti DNA-sekvenssiin lähelle aluetta, josta RNA-polymeraasi aloittaa transkription. Riippuen säätelijäproteiinin luonteesta ja tarkasta sitoutumisalueesta suhteessa transkription aloituspaikkaan proteiinit joko aktivoivat tai repressoivat geenin transkriptiota. Muita säätelytasoja transkription aloituksen lisäksi ovat transkription lopetus, mRNA:n puoliintumisaika, translaation säätely, translaation jälkeinen prosessointi, rekombinaatiotason säätely ja koko solua koskevat säätelyverkot (Salkinoja-Salonen, 2002).

Tässä työssä on taustaoletuksena, että mitatut mRNA-määrien muutokset vastaavat jollain tasolla solun tilaa. Huomioitavaa on kuitenkin, että erilaisten säätelytasojen vuoksi mRNA-määrien muutokset eivät välttämättä korreloi niitä vastaavien

proteiinien määrien kanssa.

## 5 Geeniekspressio pH:n vaihtelun biomarkkerina

Käytettäessä geeniekspressiota biomarkkerina vastaan tulee erilaisia haasteita, kuten ekspressoituneiden geenien spesifisyys monitoroituun olosuhteeseen nähden ja olosuhteen aiheuttaman ekspressiovasteen viive. Suuri haaste nykyisellä tekniikalla on myös geeniekspression havaitsemiseen kuluva aika. Solut voivat vastata olosuhteen muutokseen ensin nopealla stressireaktiolla, joka vaimenee ajan myötä kun solut ovat sopeutuneet muuttuneeseen ympäristöön. Sopeutuminen voi tapahtua esimerkiksi muuttamalla solukuoren rakennetta tai metaboliaa.

Taulukossa 2 on vertailtu *E. coli* -bakteerin ja nisäkkäiden proteiinisynteesin eri vaiheisiin kuluvia aikoja. Aikaskaala on huomioitava jo solunäytteiden keräysvaiheessa. Kuten taulukosta 2 havaitaan geeniekspressiomittausten kannalta olennaisen mRNA:n puoliintumisaika on bakteereilla hyvin lyhyt, ja ekspressiotasot voivat vaihdella nopeasti. Tämän takia näytteenoton tulisi olla suunniteltu siten, että näytteen käsittelystä aiheutuu mahdollisimman vähän kohinaa ekspressiosignaaliin ja että näyte säilyy mahdollisimman edustavana näytteistettyyn systeemiin nähden käsittelyn jälkeen. Pieterse *et al.* (2006) ovat tutkineet erilaisten näytteenottomenetelmien vaikutusta geeniekspressiomittautulosten hajontaan, ja parhaiksi lähestymistavoiksi osoittautui näytteen käsittelytavat, joissa solunäyte jäähdytettiin hyvin nopeasti.

**Taulukko 2.** Transkription ja translaation aikaskaalat. Muokattu lähteestä Stephanopoulos *et al.* (1998)

	<i>E. coli</i>	Nisäkkäät
Aloituis	1 s <sup>-1</sup>	10 min <sup>-1</sup>
Transkriptio	2500 $\frac{\text{nt}^*}{\text{min}}$	3500 $\frac{\text{nt}}{\text{min}}$
mRNA t <sub>1/2</sub>	1–3 min	1–20 h
mRNA:n translaatio	2700 $\frac{\text{nt}}{\text{min}}$	720 $\frac{\text{nt}}{\text{min}}$
Proteiini t <sub>1/2</sub>	20–60 min	2–100 h
*nt=nukleotidiä		

Pioch *et al.* (2007) ovat käyttäneet geeniekspressiota bioprosessin monitorointiin. Tutkimuksessa monitoroitiin *Bacillus licheniformis* -bakteerin kasvua glukoosi-, typpi- ja fosfaattirajoitetuissa olosuhteissa. Monitorointiin käytettiin *acoA*-geeniä glukosille, *glnA*-geeniä typelle sekä *pstS*- ja *phy*-geenejä fosfaatille. Transkription havait-

seminen toteutettiin helmien käyttöön perustuvalla sandwich-hybridisaatio-menetelmällä (engl. bead-based sandwich hybridization), jossa ekspressiosignaali saatiin noin tunnin viivellä (Pioch *et al.*, 2007).

Jos halutaan monitoroida vasteita erilaisille ympäristöstressseille, jotka vaikuttavat solun erilaisiin prosesseihin samanaikaisesti, haasteena voi olla spesifien vastegeenien löytäminen. Esimerkiksi Gasch *et al.* (2000) tutkivat hiivan lähes koko genomien ekspressiovasteita ajan suhteen, kun ympäristöstressinä oli lämpötilan muutos, vetyperoksidi, superoksidia muodostava menadioni, sulfhydryyliä hapettava diamidi, disulfideja pelkistävä ditiotreitoli (DTT), hyper- ja hypo-osmoottinen shokki, aminohapon rajoitus, typen lähteen rajoitus ja siirtyminen stationäärivaiheeseen. Noin 900 geeniä antoi keskenään samankaltaisen vasteen lähes kaikkiin näihin ympäristöstresseihin (Gasch *et al.*, 2000).

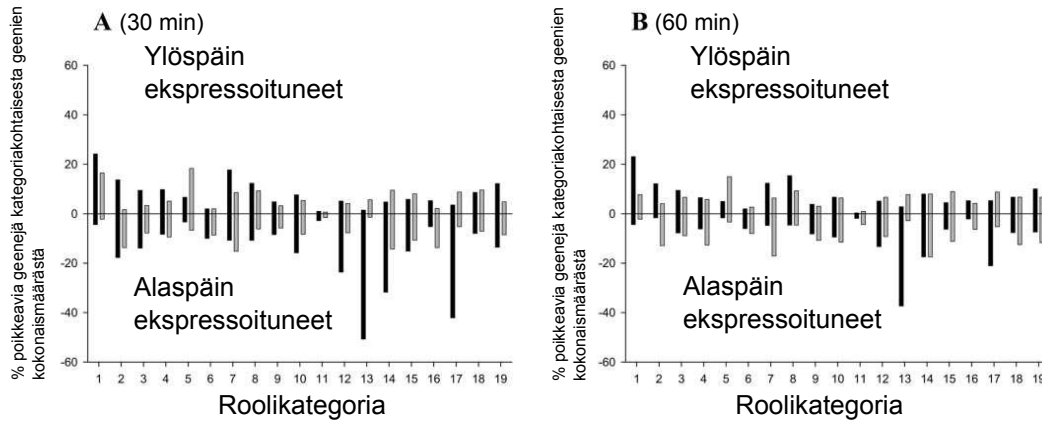
Myöskään genomiltaan yksinkertaisemmilla prokariooteilla geeniekspressiovasteet ympäristön muutoksiin eivät ole yksiselitteisiä. Esimerkiksi Atalla ja Schumann (2003) havaitsivat yli 80 geenin ekspresion vähintään kolminkertaistuneen *B. subtilis*-kasvatuksessa nostettaessa pH:ta 7,4:stä 8,9:ään. Samaan funktionaaliseen kategoriaan kuuluvat geenit voivat ekspressoitua samankaltaisesti yksittäisenkin ulkoisen muuttujan optimiolosuhteista eri suuntiin tapahtuvan muutoksen suhteen. Esimerkiksi pH:n laskiessa tai noustessa optimiolosuhteista, kuten kuvassa 3 *Shewanella oneidensis* -bakteerilla. Kuvasta voi havaita myös ajan vaikutuksen yhtenä muuttujana geenien ekspressoitumiseen.

Lisäksi haasteena geeniekspresion käytössä biomarkkerina on tulosten vertailtavuus. Absoluuttisten mRNA-määrien määrittäminen on työlästä ja suhteellisia määriä varten tarvitaan jonkinlainen vertailukohde. Tällaisena vertailukohteena voidaan käyttää ylläpitogeneeniä (engl. housekeeping gene), jonka ekspressioon stressivastegeenien ekspressiot suhteutetaan. Tämän geenin ekspresion oletetaan muuttuvan mahdollisimman vähän verrattuna muihin geeneihin tutkimuksen alaisissa olosuhdemuutoksissa. Fiocco *et al.* (2008) raportoivat *ldhD*-geenin, joka koodaa D-laktaattidehydrogenaasia, toimivan hyvänä vertailugeeninä maitohappobakteereille erilaisissa stressiolosuhteissa *Lb. plantarum* -bakteerilla. Tutkitut stressiolosuhteet kattoivat lämpö-, kylmä- ja etanolishokin. Aiemmat tutkimukset *Oenococcus oeni* -bakteerilla kattoivat myös happostressin (Desroche *et al.*, 2005).

## 6 Haponsietokyky

Kun maitohappobakteereja käytetään elintarviketeollisuuden tuotteena, ne voivat altistua monille pH-stresseille tuotteen elinkaaren eri vaiheissa. Maitohappobakteerien pääasiallinen fermentointituote on maitohappo, joka voi ilman pH-säätöä altistaa bakteerit alhaisen pH:n stressille. Jos maitohappobakteerien kasvatuksen pH:ta pyritään ylläpitämään säädöllä, voi reaktoriin muodostua emäsgradientteja, jotka





**Kuva 3.** Eri funktionaalisten geeniryhmien ekspressoitumisia suhteessa funktionaalisten ryhmien kokonaismäärään. Mustat palkit kuvaavat vastetta ulkoiseen pH 4:ään ja harmaat ulkoiseen pH 10:een. Kohdassa A on 30 minuutin altistus ja kohdassa B 60 minuutin altistus. Funktionaaliset kategoriat ovat: 1. aminohapposynteesi, 2. kofaktorit ja prosteettiset ryhmät, 3. solukuori, 4. solun prosessit, 5. välituotteiden keskusmetabolia, 6. DNA metabolia, 7. energiametabolia, 8. rasvahappojen metabolia, 9. hypoteettiset proteiinit, 10. konservoituneet hypoteettiset proteiinit, 11. muut kategoriat, 12. proteiinien elinkaari, 13. proteiini-synteesi, 14. puriinit ja pyrimidiinit, 15. säätelytoiminnot, 16. signaalin välitys, 17. transkriptio, 18. kuljetukseen ja sitoutumiseen osallistuvat proteiinit ja 19. tuntematon funktio. Palkit nollan yläpuolella kuvaavat prosentuaalisia osuuksia geneistä, joiden ekspressio on kasvanut pH 4:ssä tai pH 10:ssä. Palkit nollan alapuolella kuvaavat vastaavasti prosentuaalisia osuuksia geneistä, joiden ekspressio on vähentynyt pH 4:ssä tai pH 10:ssä. Muokattu lähteestä Leaphart *et al.* (2006).

saattavat aiheuttaa väliaikaisen alkalisen pH-stressin. Elintarviketeollisuudessa maitohappobakteerit ovat usein erilaisissa happamuudeltaan stressaavissa tuotteissa, kuten piimissä, jogurteissa tai mehuissa. Lopulta haastavimman stressin aiheuttaa mahaneste, jonka pH vaihtelee välillä 1–5 (Marteau *et al.*, 1997).

On huomion arvoista, että orgaanisen hapon, esim. maitohappo, ja epäorgaanisen hapon, esim. HCl, aiheuttamat stressit ovat luonteeltaan erilaisia. Saarela *et al.* (2009) tutkivat *Lb. rhamnosus* E800:lla selviytymistä happostressissä HCl:ssä ja orgaanisessa omenahapossa. Bakteerit selvisivät merkittävästi huonommin orgaanisessa hapossa kuin HCl:ssä pH:n ollessa samat (Saarela *et al.*, 2009). Epäorgaanisen vahvan hapon aiheuttama stressi johtuu suoraan alhaisessa pH:ssa ilmenevistä vapaista protoneista. Protonien laskiessa solun sisäistä pH:ta  $\Delta pH$  solumembraanin yli muuttuu, mikä puolestaan muuttaa protonikäyttövoimaa (engl. proton motive force), jota tarvitaan membraanin yli tapahtuvissa kuljetusprosesseissa (Corcoran *et al.*, 2008b). Protonikäyttövoima perustuu solun ulkoisen ja sisäisen pH:n väliseen

gradienttiin. Happostressi voi myös vaurioittaa solumembraania, DNA:ta ja proteiineja (van de Guchte *et al.*, 2002). Orgaanisen heikon hapon kasvua inhiboiva vaikutus johtuu pitkälti hapon dissosioitumattomasta muodosta (Pieterse *et al.*, 2005). Dissosioitumaton muoto diffusoituu solumembraanin läpi kohti emäksisempää sytosolia (Axe ja Bailey, 1995; Hutkins ja Nannen, 1993). Tämä prosessi jatkuu kunnes saavutetaan tasapaino membraanin läpäisevän dissosioitumattoman muodon solun sisäisen ja ulkoisen konsentraation välillä (Pieterse *et al.*, 2005). Solun sisällä maitohappo dissosioituu Henderson-Hasselbach yhtälön (yhtälö 1) mukaisesti (Pieterse *et al.*, 2005). Tämä viittaisi siihen, että inhiboiva vaikutus on sitä suurempi, mitä suurempi  $\Delta\text{pH}$  solumembraanin yli on (Pieterse *et al.*, 2005). Orgaanisen hapon inhiboivan vaikutuksen epäillään johtuvan membraanipotentiaalin alentumisesta, sytosolin happamoitumisesta tai anionien kerääntymisestä solun sisälle (Pieterse *et al.*, 2005).

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{konjugaattiemäs}]}{[\text{happo}]} \right). \quad (1)$$

Haponsietokykyä voidaan kasvattaa ainakin kahden eri fysiologisen tilan kautta. Normaalin kasvatuksen pH:ta alhaisempi mieto pH-stressi logaritmisien kasvuvaiheiden aikana sopeuttaa yleisesti bakteereita kestämaan paremmin alhaista pH:ta, jossa ne eivät normaalisti selviytyisi. Tätä mekanistista prosessia kutsutaan ATR:äksi (engl. acid tolerance response) (Foster ja Hall, 1990). ATR:n on tutkittu parantavan selviytymistä mm. *Lactococcus lactis* - (Hartke *et al.*, 1996; Rallu *et al.*, 1996), *Lb. acidophilus* - (Lorca *et al.*, 2002) maitohappobakteereilla ja *Propionibacterium freudenreichii* -bakteerilla (Jan *et al.*, 2001). Toinen haponsietokykyä nostava fysiologinen tila on stationäärivaihe, jolloin haponsietokyky kasvaa yleisen stressivasteen myötä (Hartke *et al.*, 1996). Stationäärivaiheen aiheuttama vaste on yleensä ulkoisesta pH:sta riippumaton, vaikkakin vastakkaisena esimerkkinä on *Lb. acidophilus* -bakteeri, jolla tarvitaan alhainen ulkoinen pH (Lorca ja de Valdez, 2001).

Ristiinsuojauksella (engl. cross-protection) tarkoitetaan selviytymiskyvyn nostamista jotakin tiettyä stressiä vastaan käyttäen erilaista stressiä tämän saavuttamiseksi. Ristiinsuojaus saattaa vaihdella maitohappobakteereilla laji- ja jopa alalajikohtaisesti (van de Guchte *et al.*, 2002). Esimerkiksi Desmond *et al.* (2002) paransivat *Lb. paracasei* NFBC 338:lla 60 °C lämpötilan sietokykyä 300-kertaiseksi stressaamalla maitohappobakteereja ensin osmoottisella stressillä käyttäen 0,3 M NaCl-pitoisuutta. Molempien stressien kestot olivat 30 minuuttia. Parempi selviytymiskyky saavutettiin kuitenkin käyttämällä adaptointiin 52 °C lämpötilastressiä 15 minuutin ajan. Pakkaskestävyyttä on parannettu lämpöshokilla *Lb. johnsonii* -bakteerilla (Walker *et al.*, 1999). Myös selviytymistä kuivasäilytyksestä on kyetty parantamaan *Lb. rhamnosus* HN001:llä käyttäen lämpöstressiä (50 °C) ja osmoottista stressiä (0,6 M NaCl) (Prasad *et al.*, 2003). Bifidobakteereilla on todettu lämpöshokkiproteiinien DnaK:n, DnaJ:n, GrpE:n ja ClpB:n ekspression kasvattamisen parantavan stressitoleranssia yleisesti (Berger *et al.*, 2009). Vastaavasti näiden ekspression vähentäminen johtaa huonompaan stressitoleranssiin (Berger *et al.*, 2009).

On huomioitavaa, että proteiinisynteesi ei ole välttämättä edellytyksenä ATR:n saavuttamiseksi. Myös ravintoalustan koostumus vaikuttaa selviytymiseen pH-stressissä. Budin-Verneuil *et al.* (2005b) tutkimuksissa *L. lactis* MG1363:lla proteiinisynteesi inhiboitiin kloramfenikolilla käyttäen kemiallisesti tunnettua synteettistä ravintoalustaa ja rikasta kompleksia ravintoalustaa. Bakteereja happostressattiin ATR:n saavuttamiseksi HCl:llä. Tulokseksi saatiin, että kemiallisesti tunnetulla ravintoalustalla ATR:n saavuttaminen edellyttää proteiinisynteesin, mutta rikkaalla ravintoalustalla kasvatettujen bakteerien sopeutuminen ainoastaan heikkenee proteiinisynteesin ollessa inhiboitu (Budin-Verneuil *et al.*, 2005b). Synteettisellä ravintoalustalla kuolleisuus oli vastaavanlainen kuin ATR-adaptoimattomassa näytteessä raskaan happoshokin jälkeen (Budin-Verneuil *et al.*, 2005b). Kompleksilla ravintoalustalla kasvatettujen bakteerien selviytyminen oli ollut 90-kertainen verrattuna ATR-adaptoimattomaan näytteeseen (Budin-Verneuil *et al.*, 2005b).

Myös ATR:n muodostukseen käytetyllä pH:lla on todettu olevan vaikutusta proteiinisynteesin tarpeellisuuteen ATR:n saavuttamiseksi. Lorca *et al.* (1998) havaitsivat *Lb. acidophilus* -bakteerilla proteiinisynteesin inhiboinnin vaikuttavan ATR:n muodostumiseen adaptointihappamuuden ollessa 5, mutta adaptointihappamuuden ollessa 4,2 inhiboinnilla ei ollut vaikutusta ATR:n saavuttamiseen. pH:n laskuun käytettiin maitohappoa eikä HCl:ää, mikä osaltaan voi vaikuttaa tulokseen.

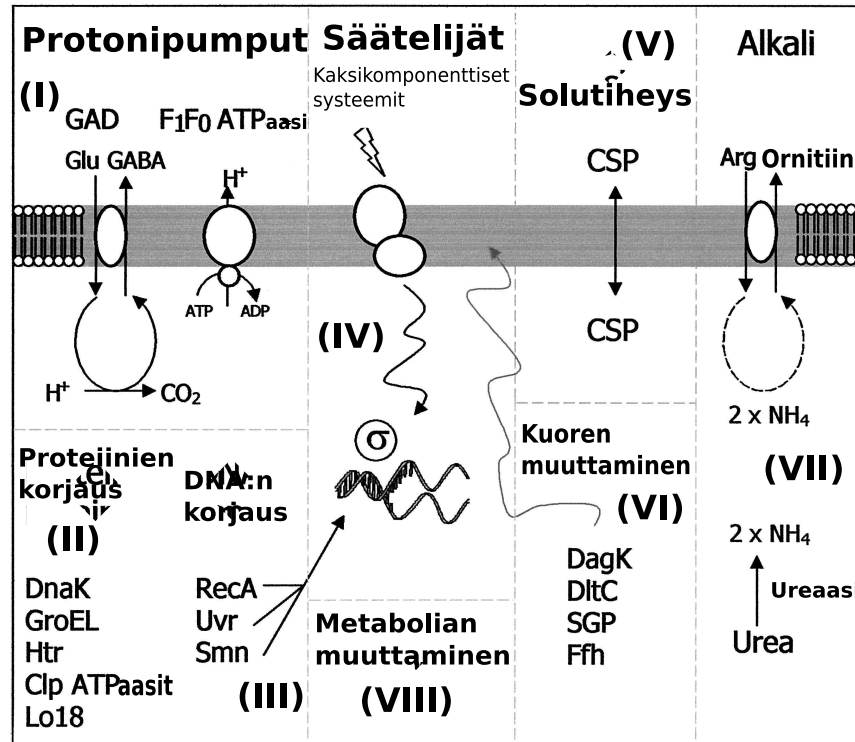
## 7 pH:n stressivastegeenit

Tässä luvussa on esitelty kirjallisuudessa ilmoitettuja pH:n stressivastegeenejä. Eri-tyishuomiota ovat saaneet muutamat geenit, joiden ekspressiota käsitellään kokeellisessa osassa. Nämä on käsitelty omissa alaluvuissaan.

Erilaiset stressit voivat antaa vasteen monella solun eri funktionaalisella alueella. Kuvassa 4 on esitetty gram-positiivisten bakteerien erilaisia suojamekanismeja pH-stressin yhteydessä. Haasteena näiden suojamekanismien ilmentymisen yhdistämisessä pH-muutoksen stressivasteeksi on, että monet yksittäiset suojamekanismit toimivat myös muissa kuin pH-sidonmaisessa stressissä.

### 7.1 Lämpöshokkigeenit

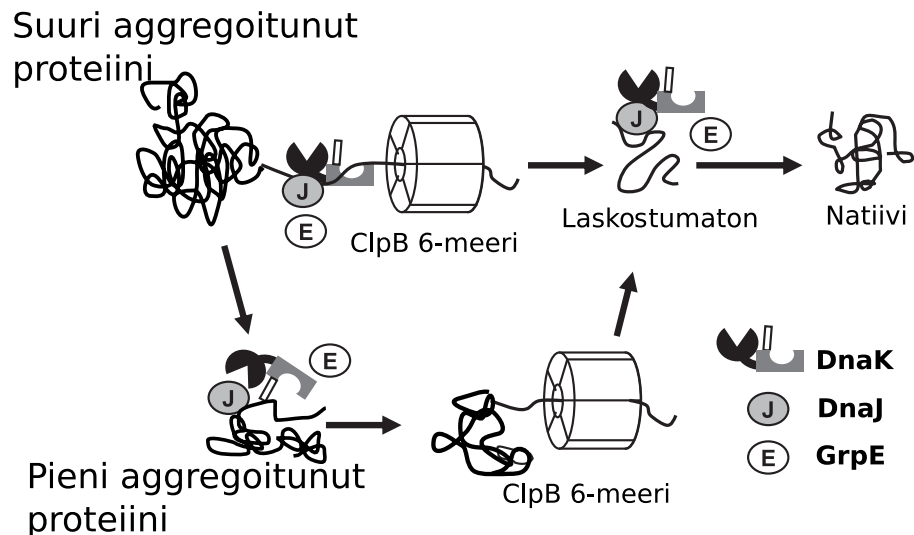
Erityisesti proteiinien ja DNA:n korjaukseen liittyviä mekanismeja pidetään yleisinä vasteina eri stresseille (van de Guchte *et al.*, 2002). Monia proteiinien korjaukseen liittyviä proteiineja, kaperoneja ja niihin liittyviä geenejä pidetäänkin yleisinä stressigeeneinä, lämpöshokkiproteiineina tai -geeneinä (engl. heat shock protein; Hsp). Tämä ryhmä sisältää Hsp100:t, Hsp90:t, Hsp70:t, Hsp60:t, Hsp40:t ja pienet



**Kuva 4.** Graafinen esitys gram-positiivisten bakteerien hyödyntämistä suojamekanismeista. Nämä on jaettu kahdeksaan eri kategoriaan: (i) Protonipumput, kuten  $F_1F_0$ -ATPaasi, ja GAD-systeemi mahdollistavat solun sisäisen pH:n ylläpidon. GAD-systeemissä glutamaatti dekarboksyloidaan, mikä kuluttaa solun sisäisen vapaan protonin kasvattaen solun sisäistä pH:ta. (ii) Proteiinien korjaus, joka sisältää kaperonit (engl. chaperone), proteaasit ja lämpöshokkiproteiinit. Nämä mahdollistavat proteiinien korjauksen ja vaurioituneiden proteiinien hajotuksen. (iii) Alhaisen pH:n vaurioittama DNA voidaan korjata poistamalla virheitä tai aloittamalla DNA:n kahdentuminen keskeytyneistä kahdentumishaaroista uudelleen. (iv) Kaksikomponenttisten signaalinvälittäjien ja  $\sigma$ -tekijöiden osallistuminen aiheuttaa paikallisia tai globaaleja vasteita. (v) Solutiheys vaikuttaa solujen väliseen kommunikaatioon. (vi) Solukuoren muutokset, kuten muutokset arkkitehtuurissa, koostumuksessa, stabiilisuudessa ja aktiivisuudessa, voivat suojata soluja. (vii) Tuottamalla alkaleita arginiinideiminaasi- tai ureaasisysteemillä voidaan nostaa solun sisäistä pH:ta. (viii) Metabolisia ominaisuuksia voidaan muuttaa. (Cotter ja Hill, 2003)

Hsp:t (numero viittaa perheen jäsenten tyypilliseen molekyylimassaan) (Sugimoto *et al.*, 2008). DnaK/Hsp70, GroEL/Hsp60 ja muutamat Clp-perheen proteiineista ovat hyvin säilyneet maitohappobakteereissa (Sugimoto *et al.*, 2008). Huonommin maitohappobakteereissa säilyneitä Hsp:itä ovat Lon-proteaasi, pienet Hsp:t ja Hsp33 (Sugimoto *et al.*, 2008). Malliorganismi *E. coli* -kantaan verrattuna maitohappobakteereilta puuttuu Hsp90 (Sugimoto *et al.*, 2008).

Yleisesti molekyyliset kaperonit pystyvät sitoutumaan laskostumattomiin tai osittain laskostuneisiin proteiineihin. Sitoutuminen tapahtuu suurella affiniteetilla proteiinirungon hydrofobisiin osiin ja osiin, jotka ovat peittyneet laskostuneessa proteiinissa, mutta paljastuvat laskostuneen rakenteen purkaututtua. Kaperonien ja ei-natiivien proteiinien hydrofobisten osien väliset heikot vuorovaikutukset suojaavat molekyyliden väliseltä aggregoitumiselta, ja voivat myös estää molekyylin sisäisiä laskostumisvirheitä. Kaperoniin kiinnittyneen proteiinin vapauttaminen tapahtuu usein adenosiinitrifosfaatin (ATP) kustannuksella, jolloin kaperonien konformaatio muuttuu. Kaperonien aggregoitumiselta suojaava aktiivisuus on usein riippumaton ATP:sta, kun puolestaan laskostamiseen liittyvä aktiivisuus on ATP-riippuvaista. Lisäksi tietyt Hsp100/Clp-perheen kaperonit pystyvät purkamaan laskostuneita proteiineja ATP:n kustannuksella. Kuvassa 5 on esimerkkinä esitetty malli DnaK-ClpB kaksoiskaperonisysteemin toiminnasta (Sugimoto *et al.*, 2008).



**Kuva 5.** Esimerkkinä kaperonien toiminnasta DnaK-ClpB kaksoiskaperonisysteemin kautta tapahtuva proteiinikeräytymien purkautuminen ja proteiinien uudelleen laskostuminen. Muokattu lähteestä Sugimoto *et al.* (2008).

## 7.2 Lämpöshokin transkription säätely, *HrcA*

*HrcA* on repressor, joka säätelee negatiivisesti lämpöshokkigeenien kuten *groES-groEL* transkriptiota (Zuber ja Schumann, 1994). Negatiivisessa säätelyssä repressorin läsnäolo estää kohdeoperonin transkription. *HrcA* säätelee myös monien maitohappobakteerien Clp-proteaaasien synteesiä. *HrcA*:n säätelyä vastaava promootorialue on *clpL*:ää edeltävässä sekvenssissä esim. *Lb. gasseri* -bakteerilla (Suokko *et al.*, 2008), ja *Lb. bulgaricus* -, *Lb. johnsonii* - sekä *Lb. acidophilus* -bakteereilla *clpP*:tä ja *clpE*:tä edeltävissä sekvensseissä (van de Guchte *et al.*, 2006). Firmikuu-teilla, joihin LGG kuuluu, *hrcA* on yleisesti osana *dnaK*-operonia (Servant ja Mazo-

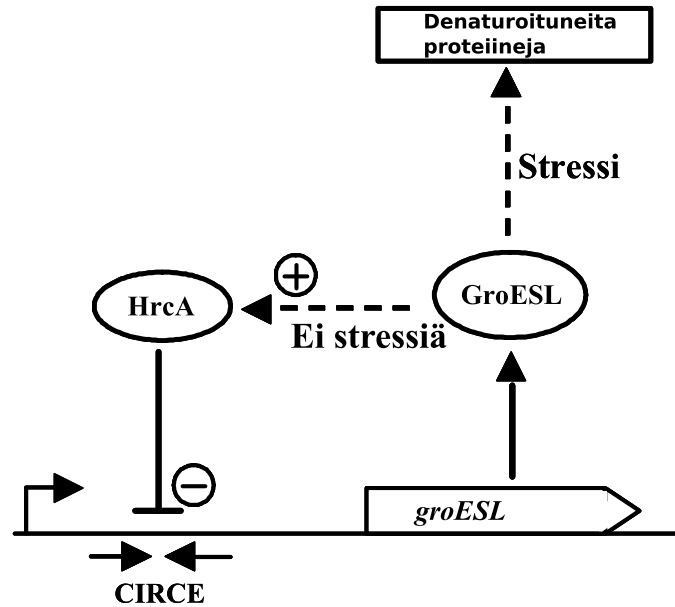
dier, 2001). Operoni koostuu yhdestä tai useammasta geenistä, joiden transkription säätely tapahtuu yhtenäisesti. DnaK-operoni koostuu firmikuuteilla usein neljästä geenistä *hrcA-grpE-dnaK-dnaJ* (Servant ja Mazodier, 2001). Näin näyttäisi olevan myös LGG:llä genomidatan perusteella (Baker *et al.*, 2000).

HrcA toimii osana HrcA-CIRCE-repressorisysteemiä, jossa kaperoniekspression säätelevä käänteistoisto (CIRCE; engl. controlling inverted repeat of chaperone expression) on promoottorialue, johon HrcA kiinnittyy (Zuber ja Schumann, 1994). CIRCE-alue on kohdesekvenssiä edeltävässä sekvenssikohdassa sekvenssi TTAGCACTC, jota seuraa yhdeksän vaihtelevaa nukleotidia. Näiden jälkeen edeltävässä sekvenssikohdassa on käänteistoisto GAGTGCTAA. HrcA:n oletetaan muodostavan steerisen esteen RNA-polymeraasille, jolloin säädeltävien geenien ekspressio repressoituu (Suokko, 2008). CIRCE-alue esiintyy mm. *B. subtilis* - (Zuber ja Schumann, 1994) ja *Lb. plantarum* -bakteereilla (Sugimoto *et al.*, 2008) sekä myös LGG:llä (Baker *et al.*, 2000). LGG:llä CIRCE-alue edeltää *groES-groEL*-operonin lisäksi geenejä *ohrR*, LGG\_01822, *hrcA*, LGG\_02804, *ygfA* ja *clpL* (Baker *et al.*, 2000). Näistä *ohrR* on orgaanisten hydroperoksidien kestävytyteen liittyvän transkription säätelijä, LGG\_01822 transkriptoi hypoteettista proteiinia, LGG\_02804 transkriptoi Hsp20-perheeseen kuuluvaa pientä lämpöshokkiproteiinia ja *ygfA* transkriptoi mikrobivastaisen peptidin kuljetukseen liittyvää ABC-transportteria (engl. ATP-binding cassette transporter) (Baker *et al.*, 2000). Osalla näistä CIRCE-alue esiintyy yhden tai kahden emäsparin vajauksella.

HrcA-repressoriproteiini aggregoituu ja muuttuu toimimattomaksi *in vivo*, kun GroEL titrautuu pois stressissä denaturoituneiden proteiinien myötä (Babst *et al.*, 1996; Mogk *et al.*, 1997). Tämä johtaa lämpöshokkigeenien derepressioon ja niiden transkription kasvuun (Babst *et al.*, 1996; Mogk *et al.*, 1997). Lämpöshokkigeenien ekspressio kytkeytyy pois, kun denaturoituneiden proteiinien määrä laskee. Tällöin GroEL-konsentraatio kasvaa, mikä johtaa HrcA:n aktivoitumiseen ja HrcA-regulonin repression (Suokko, 2008). HrcA-säätelyn periaatteet on havainnollistettu kuvassa 6. Tässä esitetyn HrcA-säätelyn periaatteiden malliorganismina on *B. subtilis*.

HrcA:n säätelemän *groESL*-kaperonien operonin ekspressoitumisen on havaittu koreloivan pakastussäilyvyyden kanssa (Walker *et al.*, 1999). *groESL*:illa viitataan *groES-groEL*-systeemiin. *Lb. johnsonii* -bakteerien säilyvyyttä parannettiin käyttäen ristiinsuojausta (Walker *et al.*, 1999). Kasvatuksen lämpötila nostettiin 55 °C:een 45 minuutiksi, jolloin *groES*- ja *groEL*-geenien transkriptio kasvoi (Walker *et al.*, 1999). Näin käsitellyt bakteerit selvisivät paremmin 7 päivän -20 °C:een säilytyksestä kuin kontrollibakteerit (Walker *et al.*, 1999).





**Kuva 6.** Lämpöshokissa denaturoituneet proteiinit titraavat GroESL:in, mikä johtaa lämpöshokkigeenien ekspression derepressioon. Kuva muokattu lähteestä Suokko (2008).

### 7.3 $F_1F_0$ -ATPaasi

$F_1F_0$ -ATPaasi on entsyymikompleksi, joka voi sekä syntetisoida ATP:tä käyttäen protoneja että kuljettaa protoneja ulos solusta. Protonien uloskuljetus vie kuitenkin energiaa, jota saadaan ATP:n hydrolyysistä (van de Guchte *et al.*, 2002). Entsyymikompleksi koostuu solumembraaniin integroituneesta  $F_0$ -osasta ja ulommas-  
ta  $F_1$ -osasta.  $F_0$ -osa vastaa protonin siirrosta, vaikkakin sen aktiivisuus kasvaa  $F_1$ -proteiinien ekspression myötä.  $F_1$ -proteiinit toimivat mahdollisesti kuljetuskanavan tukirakenteina tai porttina.  $F_1$ -kompleksi koostuu  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ja  $\epsilon$  alaosista. Sillä on ATPaasi-aktiivisuus, kun se on vapautuneena membraanista ja muodostaessaan kompleksin  $F_0$ -osan kanssa se katalysoi ATP-synteesiä tai -hydrolyysiä riippuen protonivirran suunnasta (Fillingame ja Divall, 1999).

Maitohappobakteereissa ATP:n hydrolyysi ja protonien uloskuljetus kasvaa alhaisessa pH:ssa (Futai *et al.*, 1989; Nannen ja Hutkins, 1991). Mutanttikokeissa, joissa heikennettiin  $F_1F_0$ -ATPaasin aktiivisuutta eri maitohappobakteereilla, alhainen pH aiheutti kasvuhäiriöitä *Enterococcus faecalis* - (Suzuki *et al.*, 1988), *L. lactis* - (Amachi *et al.*, 1998), *Lb. helveticus* - (Yamamoto *et al.*, 1996) ja *O. oeni* -bakteereilla (Tourdot-Maréchal *et al.*, 1999). *O. oeni* -kasvustosta saatiin myös eristettyä haponsietokykyinen mutantti, jolla oli kasvanut  $H^+$ -ATPaasi-aktiivisuus (Drici-Cachon *et al.*, 1996).  $F_1F_0$ -ATPaasin aktiivisuuden kasvun haittapuolena pH:n laskiessa on kuitenkin, että sen energeettiset kustannukset voivat johtaa kasvun pysähtymiseen (Bond ja Russell, 1996).

Yleisesti ei voida sanoa, että alhainen pH vaikuttaisi  $F_1F_0$ -ATPaasia koodaavien geenien transkription säätelyyn tai translaatioon. *Enterococcus hirae* -bakteerilla translaation havaittiin stimuloituvan alhaisessa pH:ssa, mutta tämä oli liian vähäistä että sillä olisi voitu selittää  $F_1F_0$ -ATPaasin määrän kasvu (Arikado *et al.*, 1999). Toisaalta *Lb. acidophilus* -bakteerilla  $F_1F_0$ -ATPaasin alayksiköitä vastaavien geenien transkriptio kasvoi alhaisessa pH:ssa, mitä seurasi kaksinkertainen kasvu entsyymin aktiivisuudessa (Kullen ja Klaenhammer, 1999).

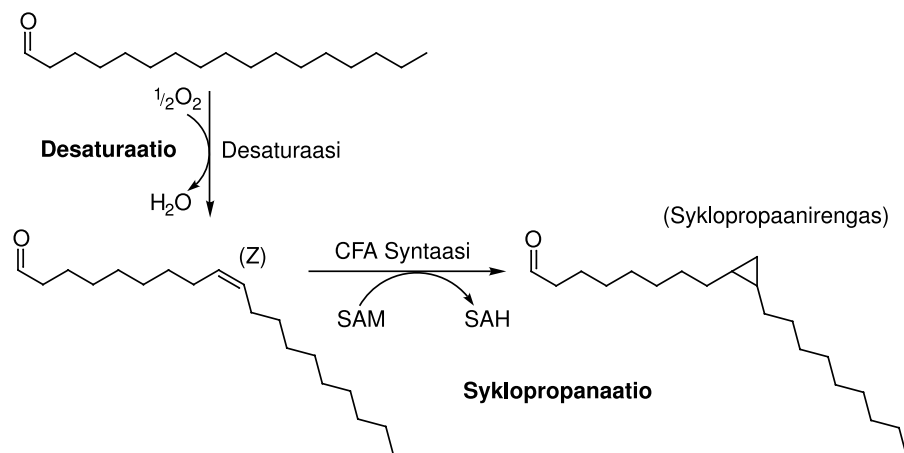
Myös Lee *et al.* (2008) tutkimuksista *Lb. reuteri* -bakteerilla käy ilmi, että *atpA*-proteiinin (ATP-syntaasi  $F_1$ ,  $\alpha$ -alayksikkö) määrä ei kasva lineaarisesti pH:n laskiessa, mikä kyseenalaistaa sen soveltuvuuden ulkoisen pH:n biomarkkeriksi. Kasvu-ympäristön vertailuhappamuutena käytettiin pH:ta 6,8. Laskettaessa pH:ta 5,0:aan *atpA*-proteiinitaso 14,1-kertaistui, kun pH 4,5:ssä se laski 0,01-kertaiseksi. Proteiinitaso nousi kuitenkin 2,9-kertaiseksi lähtötasosta laskettaessa pH:ta vielä alemmas pH 4:ään (Lee *et al.*, 2008). Lisäksi *atpA*:ta ja muita ATPaasin alayksiköitä koodaavien geenien ekspressiotasojen on havaittu kasvavan korkeassa pH:ssa (Wilks *et al.*, 2009; Stolyar *et al.*, 2007). Tästä seuraavan ATP-syntaasin kasvun on selitetty kompensoivan korkeassa solun ulkoisessa pH:ssa vähentynyttä protonikäyttövoimaa (Maurer *et al.*, 2005). Korkeassa ulkoisessa pH:ssa solun ulkoisen ja sisäisen pH:n välinen gradientti on käänteinen normaaleihin kasvuolosuhteisiin verrattuna. Vaikka  $F_1F_0$ -ATPaasin ilmentymisen merkitys biomarkkerina on kyseenalainen, sen merkitys pH:n muutoksen sietämiselle on selvästi merkittävä edellä mainittujen mutanttikokeiden perusteella.

## 7.4 Lipidikalvon muutokset

Monet bakteerit muokkaavat solukalvojensa fosfolipidien asyyliketjuja vasteena kasvuympäristön muutokseen. Yksi näistä muutoksista on *cis*-kaksoissidoksen muunnos syklopropanimuotoon, minkä on havaittu olevan yhteydessä happamaan kasvuympäristöön sopeutumiseen. Kuvassa 7 on esitetty fosfolipidin syklopropanointi. Tämä voi tapahtua tyydyttyneen ketjun desaturoinnin kautta ensin monotyydyttymättömään *cis* (Z)-muotoon ja metyloitua siitä edelleen syklopropanirenkaaksi (kuten kuvassa 7). Metyylin luovuttajana on S-adenosyylimetioniini (SAM). On kuitenkin yleisempää, että *cis* (Z)-muotoiset fosfolipidit muodostuvat jo suoraan rasvahapposynteesistä, ja myöhempi muokkaus tapahtuu vain syklopropanoinnin osalta (Cronan, 2002). Myös laktobasillien ja bifidobakteerien on raportoitu muodostavan solukalvoonsa metyloinnin kautta metyleenioktadekaanihappoa (CFA), joka on syklopropanirenkaan sisältävä rasvahappo (Johnsson *et al.*, 1995; Veerkamp, 1971). *Lb. casei* 4646:lla on havaittu CFA:n suhteellisen määrän kasvavan solukalvossa ja palmitiinihapon vähenevän kasvuympäristön pH:ta laskettaessa (Fozo *et al.*, 2004).

Wang *et al.* (2005) tutkivat *Lb. acidophilus* RD758:n pakastussäilyvyyttä. Tutkimuksessa vaihdeltiin kasvatuksen pH:ta ja lämpötilaa. Bakteerin solukalvossa havaittiin





**Kuva 7.** Solukalvon fosfolipidien syklopropanointi. Muokattu lähteestä Cronan (2002).

13 eri tyyppistä rasvahappoa, joiden koostumuksen muutosta seurattiin kasvuym-  
päristön pH:n ja lämpötilan muuttuessa. Näistä merkittävimmäksi pakastussäily-  
vyyden kannalta osoittautui CFA:n suhteellinen määrä. CFA:n suhteellisen mää-  
rän kasvaminen ei ole spesifi pH:n muutokselle, vaan sekä kasvatusympäristön pH:n  
laskeminen että lämpötilan laskeminen kasvattivat syklopropanoidun muodon mää-  
rää. *Lb. acidophilus* RD758:lle optimaalinen pH kasvulle on 6 ja lämpötila 37°C,  
kun taas pakastussäilyvyydelle parhaat arvot olivat pH 5 ja lämpötila 30°C (Wang  
*et al.*, 2005). Metyleenioktadekaanihapon synteesissä tarvittavan CFA-syntaasin se-  
kä sitä koodaavan *cfa*-geenin määrän on myös osoitettu lisääntyvän kasvatettaes-  
sa kasvuoptimia alhaisemmassa pH:ssa *L. lactis* MG1363:lla (Budin-Verneuil *et al.*,  
2005a,b). Myös CFA:n muodostukseen tarvittavan SAM:in syntetisointiin liittyvän  
SAM-syntaasin tason on ilmoitettu kasvavan *Lb. reuteri* -bakteerilla pH:n laskiessa  
(Lee *et al.*, 2008).

Chang ja Cronan (1999) tutkivat happamuuden sietokykyä *E. coli* -kannalla, jon-  
ka *cfa*-geeni oli sammutettu. Kanta selvisi poikkeuksellisen huonosti, kun kasvu-  
ympäristön pH:ta laskettiin nopeasti stationäärivaiheen alussa neutraalista 3:een.  
Eksponentiaalivaiheessa olevat *E. coli* -solut ovat paljon herkempiä happoshokille  
kuin stationäärivaiheessa olevat solut. Selviytymiskyky kasvaa kuitenkin huomattavasti,  
jos eksponentiaalivaiheessa olevat solut altistetaan lievälle happamuudelle  
(pH 5) ennen altistamista alhaisemmalle pH:lle (pH 3). Tällaisen käsittelyn jälkeen  
eksponentiaalivaiheessa olevien solujen *cfa*-geenin transkriptoituminen on kasvanut  
(Cronan, 2002). CFA-syntaasin määrän on myös havaittu lisääntyvän kasvatuksen  
eksponentiaalivaiheen vaihtuessa stationäärivaiheeseen (Wang ja Cronan, 1994), mi-  
kä osaltaan selittäisi parempaa happaman sietoa stationäärivaiheessa.

Shabala ja Ross (2008) tutkivat CFA:n fysiologista merkitystä *E. coli* -bakteerilla.  
CFA näytti osallistuvan pH-homeostaasin ylläpitoon vähentämällä solukalvon läpäi-  
sevyyttä vähentäen näin vetyionien sisäänvirtausta. Myös kyky erittää vetyioneja

solukalvon ulkopuolelle näytti paranevan CFA:n läsnäollessa. Vertailukohteena oli kanta, jolta puuttui *cfa*-geeni.

Syklopropanirenkaiden muodostaminen lipidiketjuihin on energieettisesti kallista. Jokainen renkaan muodostaminen kuluttaa kolme ATP-molekyyliä (Taylor ja Cronan, 1976). CFA-syntaasin ylituotannon tai sen täydellisen puuttumisen ei ole kuitenkaan havaittu vaikuttavan kasvunopeuteen, biomassan saantoon tai selviytymiseen normaaleissa laboratorio-olosuhteissa (Grogan ja Cronan, 1997).

CFA:n määrä ei kuitenkaan yksinään selitä selviytymistä happamissa oloissa. Muokattu *E. coli* -kanta, jolta puuttui *cfa*-geeni, selviytyi rikkaassa ravintoalustassa, muttei ravinteiltaan minimaalisessa ravintoalustassa (Chang ja Cronan, 1999). *cfa*-geenin ekspressoitumista ei voida myöskään pitää yksiselitteisenä biomarkkerina pH:n alentumiselle. CFA:n määrän on havaittu kasvavan myös osmoottisessa stressissä (Guillot *et al.*, 2000) ja lämpöstressissä (Broadbent ja Lin, 1999). Toisaalta tämä viittaisi CFA:n osallistuvan stressien ristiinsuojaukseen.

## 7.5 Asetoiinin muodostus

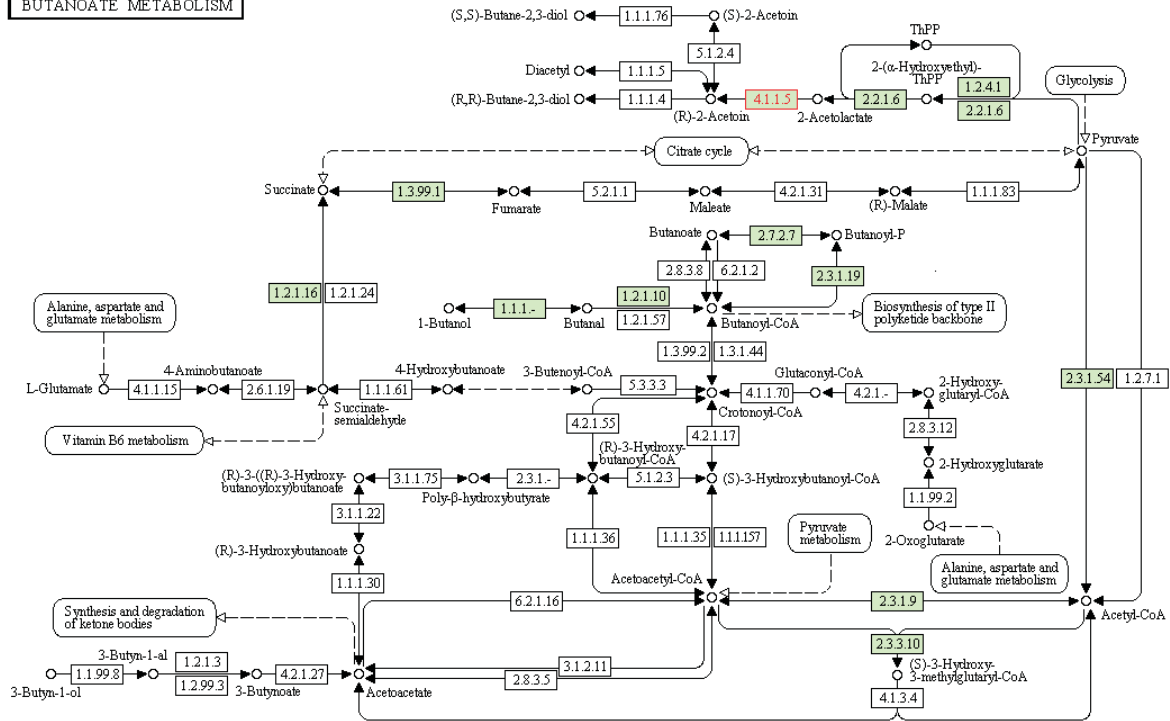
Asetoiinin tuoton on havaittu osallistuvan pH-homeostaasin ylläpitoon *Lb. plantarum* -bakteerilla (Tsau *et al.*, 1992). Asetoiinia muodostuu puryvaatista, joka toimii katabolisena välituotteena maitohappobakteereilla myös muille lopputuotteille, kuten maitohapolle, etikkahapolle, asetaldehydille, etanolille ja diasetyylille (Hickey *et al.*, 1983; Kandler, 1983). Maitohappobakteereilla diasetyyliin ja asetoiinin tuottoon johtava metaboliareitti (kuva 8) on käytössä vain, jos solussa on ylen määrin pyruvaattia suhteessa NAD<sup>+</sup>-regenerointitarpeeseen (Axelsson, 2004). Alhainen pH, ilmastus ja alhainen sokerikonsentraatio kasvuympäristössä suosivat diasetyyli/asetoiini-reittiä (Axelsson, 2004). Reittiä pidetään myös osana NAD/NADH-suhteen säätelyä bakteereilla (Speck ja Freese, 1973; Magee ja Kosaric, 1987), koska diasetyyliin ja asetoiinin välinen reaktio voi tapahtua molempiin suuntiin yhtälön 2 mukaisesti (Kanehisa *et al.*, 2008). Diasetyyli vastaa alhaisina konsentraatioina (alle 5 mg kg<sup>-1</sup>) maitotuotteiden voimaisesta mausta (Wood, 1998).



Entsyyminä asetoiinin muodostuksessa toimii kuvan 8 mukaisesti alfa-asetolaktaattidekarboksylaasi. Tätä vastaavan *aldB*-geenin transkription havaittiin kasvavan happostressissä *B. subtilis* - (Wilks *et al.*, 2009) ja *Staphylococcus aureus* -bakteereilla (Bore *et al.*, 2007). Lisäksi *aldB*:n transkriptointi väheni pH:ta nostettaessa *B. licheniformis* -bakteerilla (Hornbæk *et al.*, 2004).

Asetolaktaatti on välituote, josta muodostetaan asetoiinia. Asetolaktaatin synteesiä katalysoi asetolaktaattisyntaasi (kuva 8). Asetolaktaattisyntaasin muodostumista havaittiin Budin-Verneuil *et al.* (2005b) tutkimuksissa *L. lactis* MG1363:lla kemialli-

## BUTANOATE METABOLISM



**Kuva 8.** *Lb. casei* ATCC 334:n asetoiiniin ja diasetyyliin johtava metabolia. Punaisella on merkitty alfa-asetolaktaattidekarboksylaasin sijainti (Kanehisa *et al.*, 2008).

sesti tunnetulla ravintoalustalla happostressissä. Tutkimuksessa käytettiin kemiallisesti tunnettua ravintoalustaa ja rikkaa ravintoalustaa. Rikkaalla ravintoalustalla ei havaittu asetolaktaattisyntaasin muodostumista, mikä viittaisi myös ravintoalustalla olevan vaikutusta diasetyyli/asetoiini-reitin toimintaan. Alfa-asetolaktaattidekarboksylaasin muodostumista ei raportoitu (Budin-Verneuil *et al.*, 2005b).

## 7.6 Fosfaattispesifien ABC-transportterien ekspressoitumisen korkeassa pH:ssa

Fosfaattispesifit ABC-transportterit ovat aktiivisia transporttereita, jotka kuljettavat fosfaattia soluun ATP:n kustannuksella. Webb *et al.* (1992) on kuvannut *E. coli*-bakteerin fosfaattispesifin kuljetussysteemin rakenteen. Se koostuu neljästä erilaisesta proteiinista, PstS:stä, PstA:sta, PstC:stä ja PstB:stä. PstS-proteiini sijaitsee periplasmisessa tilassa ja kiinnittyy fosfaattiin. PstA ja PstC ovat hydrofobisia ja niiden oletetaan muodostavan transportterin membraanin läpäisevän osan. PstB on hydrofiilinen ja sen oletetaan muodostavan sytoplasmisen puoleisen osan (Webb *et al.*, 1992). Gram-positiivisille bakteereille, kuten LGG:lle, rakenne on hieman erilainen periplasmisen tilan puuttuessa. Näillä substraatin sitova proteiini on usein lipoproteiini, joka on kiinnittynyt sytoplasmisen membraanin ulkopuolelle (Davidson *et al.*,

2008).

Fosfaattispesifin ABC-transportterin proteiineja vastaavien geenien ekspressoitumisen on havaittu kasvavan optimaalista pH:ta emäksisemmässä ympäristössä mm. *B. licheniformis* - (Hornbæk *et al.*, 2004), *B. subtilis* - (Atalla ja Schumann, 2003) ja *Listeria monocytogenes* - (Giotis *et al.*, 2008) sekä *Clostridium acetobutylicum* - bakteereilla (Fischer *et al.*, 2006). Pst-systeemiä tarvitaan fosfaatin kuljetukseen fosfaattikonsentraation pudotessa lajispesifin kynnysarvon alapuolelle (Fischer *et al.*, 2006). *pst*-geenit ekspressoituvat siis ravintoalustalla, jossa on vähän fosfaattia, myös pH:n ollessa lähellä kasvuoptimia. On esitetty, että *pst*-systeemin indusoituminen emäksisessä ympäristössä perustuu solun huonoon fosfaatin saantiin (Atalla ja Schumann, 2003; Hornbæk *et al.*, 2004). Atalla ja Schumann (2003) esittävät, että emäs vaurioittaa muiden fosfaattia sisäänottavien kuljetussysteemien kolmiulotteista rakennetta. Tällöin näiden kuljetussysteemien affiniteetti fosfaatille alenee ja *pst*-systeemi indusoituu. Hornbæk *et al.* (2004) esittävät lisäksi, että kasvuympäristön pH:n nousu siirtää fosfaatin kemiallista tasapainoa. Tämä kasvattaa  $\text{PO}_4^{3-}$ - ja  $\text{HPO}_4^{2-}$ - konsentraatioita  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ - ja  $\text{H}_3\text{PO}_4$ -konsentraatioiden laskiessa. Ravintoalustan sisältäessä kalsiumia ja magnesiumia voi tällöin muodostua huonosti liukenevia yhdisteitä, kuten  $\text{Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ,  $\text{MgHPO}_4$ ,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ja  $\text{CaHPO}_4$ , mikä laskisi fosfaatin saatavuutta.

## 8 qPCR-menetelmä

Kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio (engl. quantitative polymerase chain reaction; qPCR) on menetelmä, joka pohjautuu perinteiseen polymeraasiketjureaktioon (PCR). PCR:n periaatteet on esitelty havainnollisesti lähteessä Anonym. (2008). PCR:ssä monistetaan yksittäistä tai muutamaa DNA-juostetta eksponentiaalisesti. Tavallisessa PCR:ssä monistettavan kohteen määrää ei voida analysoida luotettavasti. qPCR:ssä kvantitointi perustuu fluoresenssiin, joka on verrannollinen monistettujen tuotteiden määrään. Fluoresoiva tuote saadaan käyttämällä väriaineita, jotka sitoutuvat spesifisti kaksijuosteiseen DNA:han (engl. double-stranded DNA; dsDNA), tai oligonukleotidikoettimilla, jotka ovat sekvenssispesifejä. Tässä työssä on käytetty SYBR Green I -fluoresointimenetelmää suhteellisen geeniekspression seurantaan, mutta qPCR:ää voidaan soveltaa myös moniin muun tyyppisiin tutkimuksiin esim. absoluuttisiin RNA- ja DNA-määrittelyksiin sekä genotyyppitykseen hyödyntäen sulamiskäyräanalyysiä (engl. Melting Curve Analysis). Sulamiskäyräanalyysiä voidaan hyödyntää myös monistettavan kohteen spesifisyyden varmistamiseen. RNA-määrittelyksiä varten RNA täytyy käänteistranskriptoida komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) ennen PCR:ää. Tämä luku kuvaa lyhyesti qPCR:n perusperiaatteet. Laajemmin qPCR:ää ovat katsauksessaan käsitelleet Wilhelm ja Pingoud (2003).

## 8.1 qPCR:n fluoresointimenetelmät

Ensimmäiset fluoresointimenetelmät perustuivat etidiumbromidivärjäykseen (Higuchi *et al.*, 1993). Nykyisin käytettyjä fluoresointimenetelmiä ovat SYBR Green I, hybridisaatiokoettimet, hydrolyysikoettimet, molekulaariset koettimet (engl. molecular beacon), Sunrise-alukkeet, Scorpion-alukkeet ja Light-up -koettimet. Kuvassa 9 on esitetty eri fluoresointimenetelmien toimintaperiaatteet (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

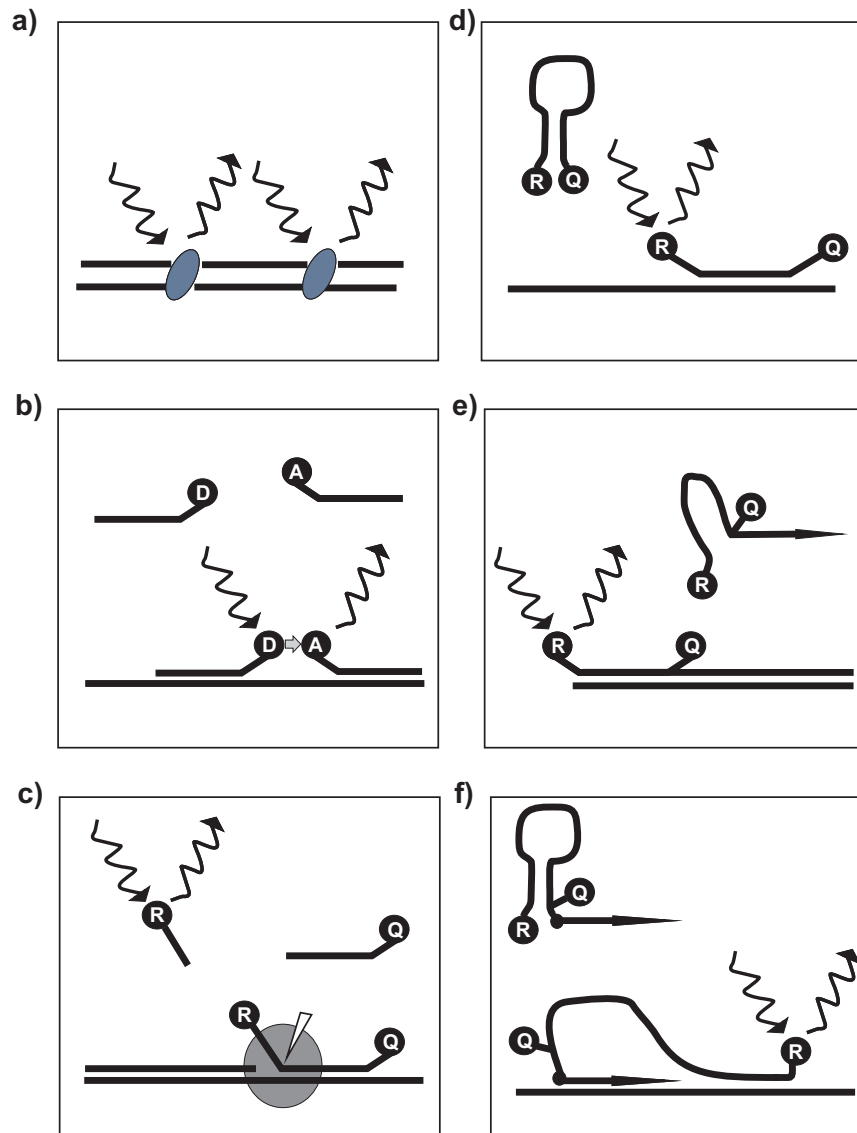
SYBR Green I -menetelmässä (kuva 9a) SYBR Green -molekyylit fluoresoivat heikosti sitoutumattomina ja 1000-kertaisena sitoutuneena dsDNA:han. Fluoresenssin voimakkuus on verrannollinen dsDNA:n määrään. Toisin kuin koettimiin perustuvat menetelmät SYBR Green I -menetelmä ei ole spesifi, vaan SYBR Green -molekyylit sitoutuvat mihin tahansa dsDNA:han sekä keskenään pariutuneisiin alukkeisiin. Tämä voi aiheuttaa virheellistä signaalia qPCR:ään (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

Hybridisaatiokoettimia käytettäessä tarvitaan luovuttajakoetin (kuva 9b (D)) ja vastaanottajakoetin (kuva 9b (A)). Luovuttajakoettimen 3'-päässä on elektroneja luovuttava leima ja vastaanottajakoettimen 5'-päässä on elektroneja vastaanottava leima. Alukkeiden pariutuessa yksijuosteiseen DNA:han luovuttaja- ja vastaanottajakoetin kiinnittyvät vierekkäin yksijuosteiseen DNA:han. Tällöin elektronin luovuttava leima virittyy. Fluoresenssina havaitaan vain virittyneen luovuttajakoettimen aiheuttama fluoresenssi (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

Hydrolyysi- eli *Taq*Man-koetin on leimattu 5'-päästä fluoresoivalla reportterilla (kuva 9c (R)) ja 3'-päästä fluoresenssin vaimentajalla (kuva 9c (Q)). PCR:n pidentymisvaiheessa, kun alukkeet ja koettimet ovat kiinnittyneet yksijuosteiseen DNA:han, *Taq* DNA-polymeraasi erottaa koettimesta sekä fluoresoivan reportterin että vaimentajan, jolloin voidaan havaita fluoresenssi (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

Molekulaariset koettimet on leimattu koettimen molemmista päistä. 5'-päässä on fluoresoiva reportteri (kuva 9d (R)) ja 3'-päässä fluoresenssin vaimentaja (kuva 9d (Q)). Molekulaarinen koetin eroaa rakenteeltaan hydrolyysikoettimesta. Molekulaarisessa koettimessa vain keskiosa on komplementaarinen DNA:n kohdesekvenssille. Koettimen päät ovat komplementaarisia toisilleen ja pariutuneet keskenään, jolloin fluoresoiva reportteri ja fluoresenssin vaimentaja ovat lähekkäin eikä fluoresenssia havaita. Alukkeiden ja koettimen kiinnittyessä yksijuosteiseen DNA:han molekulaarisen koettimen päät joutuvat erilleen toisistaan, jolloin voidaan havaita vaimentamattoman reportterin fluoresenssi (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

Sunrise-alukkeissa toimintaperiaate on samankaltainen kuin molekulaarisissa koettimissa, mutta fluoresoiva reportteri (kuva 9e (R)) ja vaimentaja (kuva 9e (Q)) ovat kiinni alukkeessa. Alukkeessa on hiuspinnirakenne 5'-päästä, jossa on fluoresoiva reportteri. DNA-polymeraasin muodostaessa kaksijuosteisen PCR-tuotteen hiuspinnirakenne avautuu, jolloin fluoresoiva reportteri ja vaimentaja joutuvat erilleen. Täl-



**Kuva 9.** Yleiset qPCR:ssä käytetyt fluoresointimenetelmät. Tekstissä on tarkempi selitys kuvaan; D, elektronin luovuttava leima; A, elektronin vastaanottava leima; R, reportterileima; Q, fluoresenssia vaimentava leima. a) SYBR Green I; b) hybridisaatiokoettimet; c) *TaqMan*-koettimet. Harmaa ympyrä kuvaa *Taq*-polymeraasia hydrolysoimassa *TaqMan*-koetinta; d) molekulaarinen koetin; e) Sunrise-alue; f) Scorpion-alue (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

löin voidaan havaita fluoresenssi (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

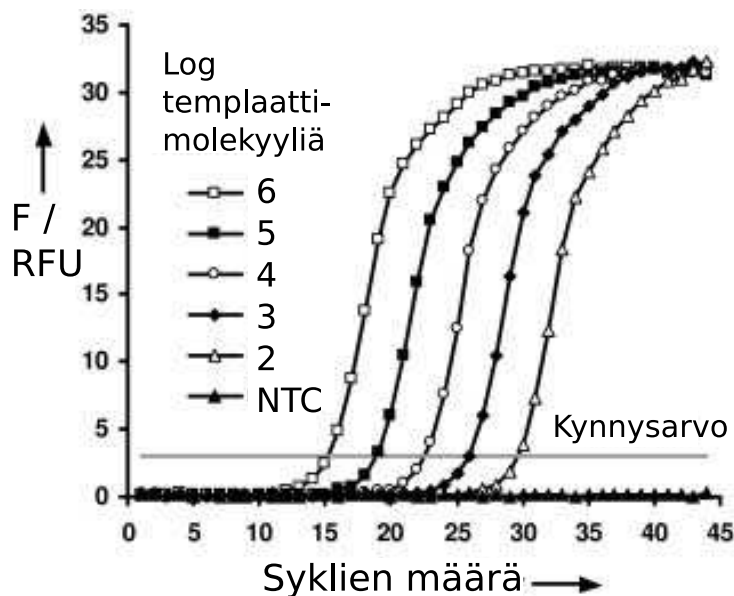
Scorpion-alukkeissa toimintaperiaate ja rakenne on samankaltainen kuin molekulaarisissa koettimissa. 5'-päässä on fluoresoiva reportteri (kuva 9f (R)) ja 3'-päässä vaimentaja sekä aluke (kuva 9f (Q)). Scorpion-alukkeiden päät ovat toisilleen komplementaarisia kuten molekulaarisissa koettimissakin ja silmukkaosa on komplemen-

taarinen kohdesekvenssille. Alukkeen 3'-pää toimii alukkeena PCR:n pidennysvaiheessa. Tällöin Scorpion-alukkeen päät erkanevat toisistaan ja silmukkaosa sitoutuu syntyneeseen PCR-tuotteeseen. Vaimentaja ja fluoresoiva reportteri ovat erillään toisistaan, jolloin voidaan havaita fluoresenssi (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

Light-up -koettimet käyttävät fluoroforinaan tiatsoli oranssia. Menetelmässä ei tarvita erillistä vaimentajaa. Periaatteena on, että fluoresenssi voimistuu koettimen hybridisoituessa DNA:n kanssa (Wilhelm ja Pingoud, 2003).

## 8.2 qPCR:n kvantitatiivinen analyysi

qPCR:n kvantitatiivisessa analyysissä määritetään fluoresenssi jokaisen monistus-  
syklin jälkeen käytettiin sitten dsDNA-spesifiä värjäystä tai sekvenssispesifijä koettimia tai alukkeita. Näin saadaan jokaista sykliä vastaava suhteellinen fluoresenssi (F/RFU), mikä voidaan esittää kuvan 10 mukaisena kuvaajana. Käyrille asetetaan kynnys (engl. threshold), joka leikkaa käyrät eksponentiaalivaiheen kohdalla. Tätä leikkauskohtaa kutsutaan kynnysarvoksi ( $C_T$ ). Näin voidaan vertailla templaattien suhteellisia määriä. Jos käytössä on standardi eli templaatti, jonka absoluuttinen määrä on tiedossa, voidaan määrittää tutkittavan templaatin absoluuttisen määrän fluoresenssi. Tämä on esitelty katsauksessa Wilhelm ja Pingoud (2003).



**Kuva 10.** Esimerkkikuvaaja suhteellisesta fluoresenssista (F/RFU) kussakin monistussyklissä. Käyrien templaatteina on ollut 100–1 000 000 kopiota. NTC on templaattia sisältämätön näyte, joka ei ole ylittänyt kynnysarvoa (Wilhelm ja Pingoud, 2003).



Tutkittaessa suhteellisia muutoksia transkriptiotasoissa, kuten tässä työssä, tai suhteellisia määriä yleensäkin, ei tarvita templaattien absoluuttisia määriä. Tällöin tunnettujen standardien sijasta käytetään vertailutranskriptia kuten ylläpitogeeniä. Suhteellisten muutosten analyysiin voidaan käyttää Livak ja Schmittgen (2001) kehittämää  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -menetelmää. Menetelmässä normalisoidaan kohdenäytteen ja vertailunäytteen ylläpitogeenin ( $C_{T,r}$ ) kynnysarvoilla seurattavan geenin ( $C_{T,t}$ ) kynnysarvot. Vertailunäyte on esimerkiksi aikapiste nolla tai käsittelemätön näyte. Näin saadaan edelleen laskettua suhteelliset kynnysarvot ( $\Delta\Delta C_T$ ) vertailunäytteeseen. Tätä voidaan kuvata yhtälöllä 3.

$$\Delta\Delta C_T = (C_{T,t} - C_{T,r})_{\text{kohde}} - (C_{T,t} - C_{T,r})_{\text{referenssi}} \quad (3)$$

Kun  $\Delta\Delta C_T$ -arvosta otetaan negatiivinen 2-kantainen logaritmi, saadaan geenin ekspresion vertailunäytteeseen verrattu suhdeluku.

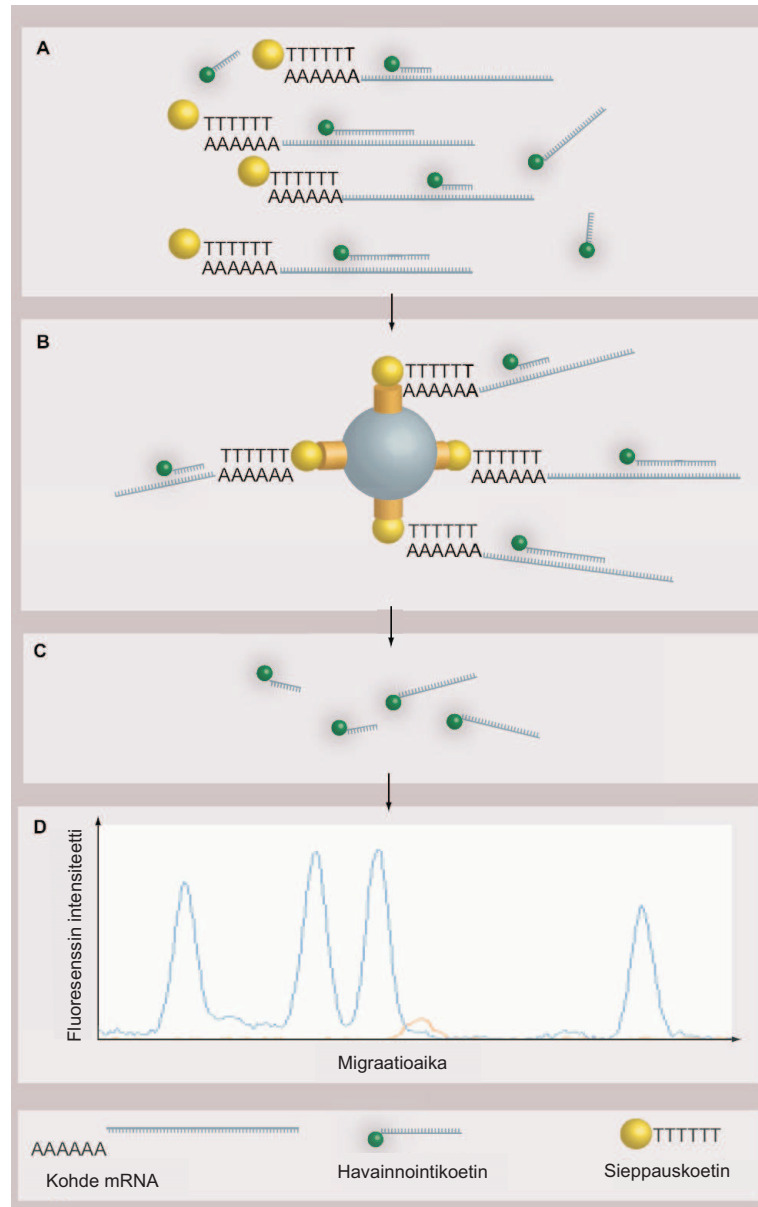
## 9 TRAC-menetelmä

TRAC-menetelmä (engl. Transcript analysis with the aid of affinity capture) on Söderlund *et al.* (2008) kehittämä menetelmä, jolla voidaan mitata transkriptiotasoja ilman että mRNA:ta tarvitsee puhdistaa tai muuntaa komplementaariseksi DNA:ksi (Söderlund ja Rautio, 2009; Söderlund *et al.*, 2008). Menetelmä koostuu kuvan 11 mukaisesti neljästä vaiheesta. Ensimmäisessä vaiheessa mRNA:n sisältävään näytteeseen lisätään eri pituisia (tavallisesti 25–45 nukleotidin kokoisia) fluoroforin sisältäviä koettimia, jotka ovat spesifejä tutkittaville geeneille. Lisäksi näyte-mRNA:han lisätään biotiinileima. Jos kohde-mRNA:lla on polyA-pää eli se on eukarioottista, voidaan käyttää biotiini-oligo(dT)-koettimia (Rautio *et al.*, 2008). Prokarioottista mRNA:ta varten biotiinileimaus voidaan tehdä esimerkiksi Satokari *et al.* (2005) esittämällä tavalla. Koettimet ja transkriptit hybridisoituvat liuoksessa kuvan 11A mukaisesti.

Menetelmän toisessa vaiheessa koetin-transkripti -kompleksit pyydystetään streptavidiini-päällysteisillä magneettisilla helmillä, mikä perustuu streptavidiinin ja biotiinin sitoutumiseen (kuva 11B). Kolmannessa vaiheessa ei-spesifisesti sitoutuneet koettimet ja muu irrallinen materiaali pestään pois. Tämän jälkeen helmistä eluoidaan irti jäljelle jääneet fluoroforin sisältävät koettimet kuvan 11C mukaisesti. Viimeisessä vaiheessa koettimet analysoidaan kapillaarielektroforeesillä, joka erottaa koettimet koon perusteella. Erottuneiden koettimien kvantitatiivinen määrä saadaan fluoresenssipiikin koosta kuvan 11D mukaisesti (Rautio *et al.*, 2008).

TRAC:ia on sovellettu pääasiallisesti juuri bioprosessien monitorointiin. Esimerkkeinä tästä on geeniekspresion stabiiliuden seuranta kemostaatissa (Rautio *et al.*, 2006b; Wiebe *et al.*, 2008) ja prosessin suoriutumisen määrittäminen seuraamalla prosessille olennaisten geenien ekspresoitumista (Rautio *et al.*, 2007a,b).





**Kuva 11.** TRAC-menetelmän periaate. A) Koettimet hybridisoituvat transkriptteihin. B) Koetin-transkripti-kompleksit pyydystetään streptavidiinipäällysteisillä helmillä. C) Helmistä eluoidut fluorofoorilliset koettimet. D) Koettimien analysointi kapillaarielektroforeesillä (Rautio *et al.*, 2008, 2006a).

## Osa II

# Kokeellinen osa

## 10 Tutkimuksen tavoite ja rakenne

Tutkimuksen tavoitteet olivat monitahoisia. Ensisijaisena tavoitteena oli selvittää kasvatusolosuhteiden muutoksen vaikutusta kirjallisuuden perusteella valittujen LGG:n kohdegeenien ekspression. Lisätavoitteina oli selvittää näiden geenien ekspresion suhdetta pakkaskestävyyteen ja haponsietokykyyn sekä vertailla kahta eri menetelmää ekspresion mittaukseen, TRAC:ia ja qPCR:ää.

Kokonaistutkimus koostui kahdesta eri osakokonaisuudesta, panoskasvatuksista ja scale-down-kasvatuksesta. Panoskasvatuksissa tutkittiin eri ravintoalustojen välisiä eroja pH:n vaihtelun aiheuttamaan LGG:n geeniekspresion muutokseen sekä kasvuun ja elävyyteen. Scale-down-kokeissa bioreaktorin ja tulppavirtausreaktorin yhdistelmässä simuloitiin lämpötila- ja pH-gradienttien vaikutuksia tuotantomittakaavan bioreaktorissa. Tässä työssä on keskitytty kasvatuksien eri tiloista otettujen näytteiden geeniekspresion tutkimiseen. Uuksulaisen (2010) diplomityössä on käsitelty yksityiskohtaisesti eri kasvatuksissa tehdyt metodologiset valinnat ja toteutustavat. Lisäksi Uuksulaisen (2010) diplomityössä on raportoitu kasvatuksiin liittyvät analyysit pakkaskestävyys- ja happostressikokeista, solutiheydestä, solukuivapainosta, solupitoisuudesta maljauksella sekä käymiskelpoisten sokerien ja solujen tuottamien aineenvaihduntatuotteiden pitoisuuksista.

## 11 Tutkimusaineisto ja -menetelmät

Tässä luvussa kuvataan käytetty tutkimusaineisto ja tutkimuksen metodologiset valinnat, sekä kerrotaan tutkimuksen toteutustapa ja käytetyt menetelmät geeniekspressiotutkimuksen osalta.

### 11.1 Bakteerikanta ja ravintoalustat

Kasvatuksissa käytettiin *Lb. rhamnosus* GG -bakteeria. Panoskasvatuksissa käytettiin laboratorioravintoalustaa ja teollista tuotantoalustaa. Scale-down-kasvatuksessa käytettiin teollista tuotantoalustaa. Ravintoalustat sisälsivät glukosia ja galaktoosia. Tarkemmat tiedot ravintoalustoista ja esikasvatuksista on selvitetty tarkemmin Uuksulaisen (2010) diplomityössä .

### 11.2 Panoskasvatukset

Tutkimukseen sisältyi neljä panoskasvatusta, joista kaksi tehtiin laboratorioravintoalustalla ja kaksi teollisella ravintoalustalla. Panoskasvatukset toteutettiin 2 dm<sup>3</sup> bioreaktorissa (Biostat MD, B.Braun Biotech International, Saksa) kasvatustilavuudella 1,5 dm<sup>3</sup>. Molemmilla alustoilla tehtiin yksi vertailukasvatus ja yksi pH-

oskillointikasvatus. Panoskasvatuksissa oskilloitiin pH:ta muuntaen pH-säätimen asetusarvoa sini-käyrän funktiona seuraavasti

$$\text{pH-asetusarvo}(T) = 5,7 + 0,5 \sin\left(\frac{2\pi}{T}t + \pi\right), \quad (4)$$

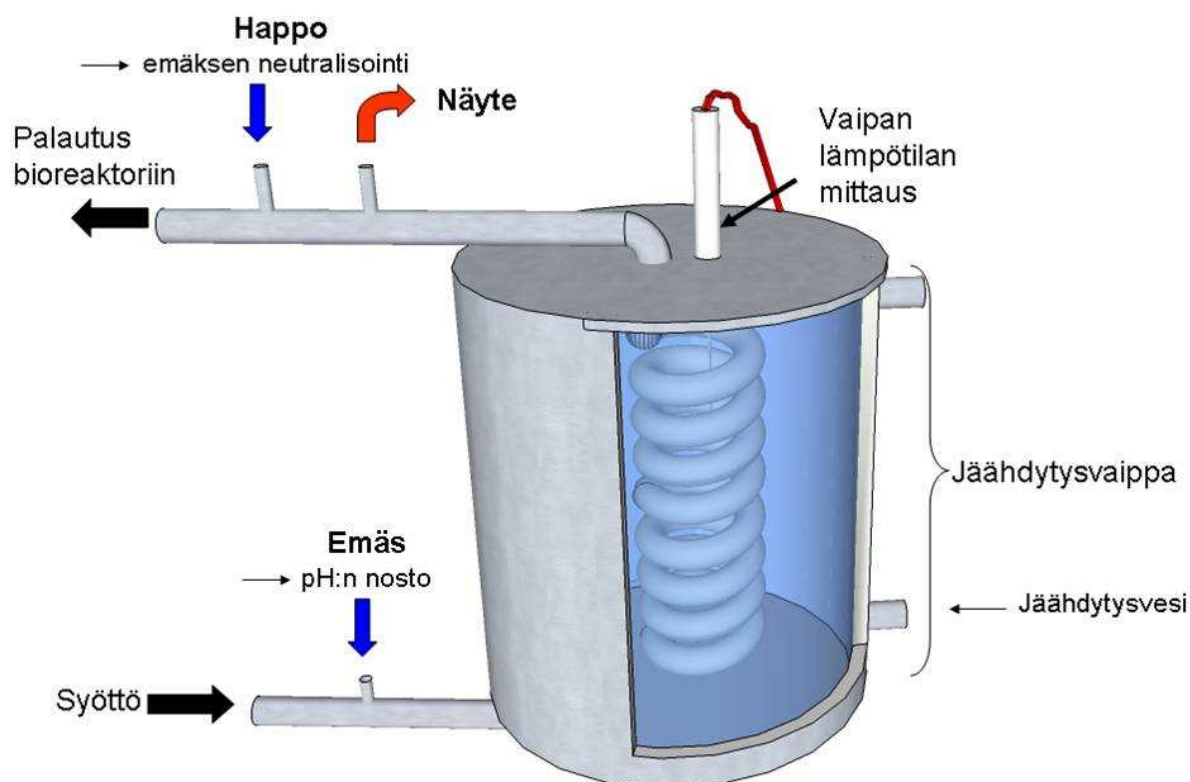
missä  $t$  on aika minuutteina ja  $T$  jaksonaika. Kasvatuksessa laboratorioravintoalustalla  $T$  oli 60 minuuttia ja teollisella ravintoalustalla 90 minuuttia. pH:n lasku aiheutui bakteerin tuottamasta maitohaposta ja nousu emäsyötöllä, joka laboratorioravintoalustalla oli 3 M NaOH:a ja teollisella ravintoalustalla 12 %  $\text{NH}_3$ :a (Uuksulainen, 2010). Panoskasvatuksista kerättiin näytteitä geeniekspressiotutkimuksia varten kasvuvaiheesta, jossa glukoosi oli loppunut ravintoalustasta ja bakteeri kasvoi eksponentiaalisesti galaktoosilla, sekä stationäärivaiheesta. Lisäksi kasvatuksista teollisella ravintoalustalla kerättiin näytteet eksponentiaalisen kasvun vaiheesta ennen glukoosin loppumista.

### 11.3 Scale-down-kasvatus

Scale-down-tekniikassa pienemmillä reaktoriosakokonaisuuksilla simuloitiin suuremman reaktorin sekoitusolosuhteita. Yhdistelmä koostui 2 dm<sup>3</sup>:n bioreaktoriosasta sekä kokeita varten suunnitellusta ja rakennetusta tulppavirtausreaktorista, joka on esitetty Uuksulaisen (2010) diplomityössä (kuva 12) .

Tulppavirtausreaktorin tilavuus oli 90 ml, joka vastasi 9 %:ia bioreaktorin kasvatus-tilavuudesta. pH- ja lämpötilamuutokset tehtiin tälle tilavuudelle. Tulppavirtausreaktorin lämpötilamuutokset toteutettiin säätämällä jäähdytysvaipan avulla lämpötila poikkeamaan bioreaktorin lämpötilasta. pH-muutosten osalta tulppavirtausreaktorin ideana oli simuloida emäksen lisäyskohtaa tuotantomittakaavan bioreaktorissa. Tulppavirtausreaktorin pH:ta nostettiin syöttämällä sisäänmenon kohtaan 3 M natriumhydroksidia (NaOH). Lisätty emäs neutraloitiin syöttämällä tulppavirtausreaktorin ulostuloon ennen bioreaktoriin palautusta ekvivalentti määrä 3 M suolahappoa (HCl). Menetelmä kerryttää bioreaktoriin natriumkloridia (NaCl), jonka pitoisuus pidettiin vakiona koejärjestelyn aikana syöttämällä reaktoriin erikseen NaCl:ää. NaCl-pitoisuus oli noin 0,2 M. Tulppavirtausreaktorin viipymäaika oli 60 sekuntia.

Kokeet koostuivat kolmesta esikokeesta, joissa oli käytössä pelkkä kemostaatti (kemostaattikoe), bioreaktori ja tulppavirtausreaktori (PFR-koe) ja bioreaktori ja tulppavirtausreaktori NaCl-syötön kanssa (NaCl-koe), sekä varsinaisista koesuunnitelman kokeista. Koesuunnitelma laadittiin Modde-ohjelmalla (Modde 8.0, Umetrics AB). Koesuunnitelman kokeet on esitetty taulukossa 3. Esikokeiden aikana lämpötila oli 37 °C ja pH:n asetusarvo 5,7, joka oli käytännössä 5,6 ottaen huomioon kuolleen alueen säädön (engl. deadband). Kokeiden välissä odotettiin, että kasvatus saavutti tasapainotilan ennen seuraavaa näytteenottoa. Tämä tarkoitti käytännössä



**Kuva 12.** Havainnollistus koejärjestelyissä käytetystä tulppavirtausreaktorista (Uuksulainen, 2010).

4–5 kasvatustilavuuden vaihtumista kemostaatissa.

Geeniekspressiotutkimuksia varten otettiin esikokeiden ja koesuunnitelman kokeiden näytteiden lisäksi näytteet kokeen 10 (taulukko 3) happostressikokeesta, jonka toteutus on selvitetty seuraavassa alaluvussa.

## 11.4 Happostressikoe scale-down-kasvatuksesta

Scale-down-kokeesta kerättiin vertailunäytteet ennen happostressikoetta ja sen lopusta, siten että lopusta otetuilla vertailunäytteillä oli sama käsittely kuin happostressikokeen näytteillä omenahapon lisäämistä lukuun ottamatta. Kaikki näytteet kerättiin kolmena rinnakkaisena otoksena.

Näyte käsiteltiin seuraavasti: Kasvatusnäytettä (10 ml) sentrifugoitiin 10 minuuttia 5000 rpm (Eppendorf Centrifuge 5804 R, USA). Putkeen jäänyttä solupellettiä pestiin kaksi kertaa PBS-puskurilla (pH 7,2). Pestyt solut suspendoitiin 2 ml:aan

**Taulukko 3.** Scale-down-kokeiden CCC-koesuunnitelma.

Koe	pH	$\ln(T)^{-1}$	T(°C)	F(NaOH) (ml/min)	F(3 M NaCl) (ml/min)
1	6,2	0,283	34,4	0,140	0,290
2	5,6	0,283	34,4	0,000	0,570
3	6,2	0,277	37,0	0,140	0,290
4	6,2	0,283	34,4	0,140	0,290
5	6,6	0,279	36,2	0,230	0,110
6	5,8	0,279	36,2	0,140	0,290
7	6,2	0,289	32,0	0,030	0,510
8	5,8	0,287	32,7	0,230	0,110
9	6,6	0,287	32,7	0,140	0,290
10	6,2	0,283	34,4	0,030	0,510
11	6,8	0,283	34,4	0,285	0,000

PBS-puskuria, jota lisättiin 0,2 ml:aa 2 ml:aan PBS-puskuria, jonka pH oli säädetty omenahapolla (Sigma Chemical Co., Japani) 3,2:een (pitoisuus 1,45 g 500 ml<sup>-1</sup>). Soluja inkuboitiin omenahappoliuoksessa 37 °C:ssa 30 min.

## 11.5 Näytteenotto

Panoskasvatuksista otettiin näyte, joka jaettiin 1 ml:n eriksi 1,5 ml:n putkiin qPCR:ää ja TRAC:ia varten. Molempia menetelmiä varten otettiin kolme rinnakkaisotosta. Näytteiden ottoon kului aikaa n. 3 min. Näytteitä sentrifugoitiin (5 min, 4 °C, 10 000 min<sup>-1</sup>)(Biofuge pico, Heraeus Instruments, Saksa). Supernatantti erotettiin näytteistä ja solupelletit siirrettiin -80 °C:een.

Näytteenotto scale-down-kasvatuksesta toteutettiin Pieterse *et al.* (2006) näytteenottovertailusta omaksutulla menetelmällä. Näin parannetaan mitattavien RNA-tasojen ja näytteenottohetken RNA-tasojen välistä korrelaatiota. Näytteenottoaika sijaitsee tulppavirran jälkeen ennen pH-gradientin neutralointia (kuva 12). Näytteet (1 ml) otettiin käsiruiskulla 1,5 ml:n putkiin. Putkia sentrifugoitiin (30 s, 4 °C, 13 000 min<sup>-1</sup>)(Biofuge pico, Heraeus Instruments, Saksa). Supernatantti otettiin talteen, minkä jälkeen solupelletit jäädytettiin nestemäisessä työssä. Jäädytetyt pelletit siirrettiin säilytykseen -80 °C:een. Rinnakkaisia näytteitä kerättiin 3 kappaletta yli 5 min välein biologisen variaation huomioimiseksi.

## 11.6 RNA:n eristys

Solupelletit sulatettiin ja solut hajotettiin entsymaattisesti käyttäen 100 µl taulukossa 4 esitettyä puskuria. Solut suspendoitiin vorteksoimalla noin 10 sekuntia.

Näytteitä inkuboitiin noin 12 minuuttia 37 °C:ssa 200 min<sup>-1</sup> ravistelussa (Minitron, Infors, Sveitsi). RNA eristettiin hajotetuista solunäytteistä käyttäen eristyspakkausta (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen, Saksa) ohjeiden mukaisesti. Eristyksessä käytettiin liuostilavuuksia < 10<sup>9</sup> bakteerimäärälle. Eristyksen lopuksi RNA eluoiitiin 50 µl:lla dietyylipyrokarbonaatti (DEPC)-käsiteltyä vettä. RNA:n eristyksessä, kuten myös DNAasi-käsittelyssä ja käänteistranskriptiossa, käytettiin DEPC-käsiteltyjä 1,5 ml:n putkia RNAasi-kontaminaation ehkäisemiseksi.

**Taulukko 4.** Solujen hajotukseen käytetty puskuri.

Tilavuus		Reagenssi
200	µl	lysotsyymi (100 mg/ml) (Lysozyme, Sigma, USA)
26	µl	mutanolysiini (25 U/µl) (Mutanolysin, Sigma, USA)
2	µl	EDTA pH 8 0,5 M (EDTA, MERCK, Saksa)
10	µl	Tris-HCl pH 8 1 M (Trizma base, Sigma, USA)(HCl, J.T. Baker, Alankomaat)
762	µl	H <sub>2</sub> O (DEPC-käsitelty)
1000	µl	

## 11.7 DNAasi-käsittely

Näytteet käsiteltiin DNAasilla genomisen DNA:n hävittämiseksi. Panoskasvatuksista lähtöisin olevat näytteet käsiteltiin RNase-Free DNase Set:illä (Qiagen, Saksa) ja scale-down-kokeista lähtöisin olevat näytteet TURBO DNA-free<sup>TM</sup>:llä (Ambion INC, USA). Molemmat käsittelyt tehtiin valmistajan tuotekohtaisten ohjeiden mukaan.

## 11.8 Käänteistranskriptio

DNAasi-käsitellyistä eristetyistä RNA-näytteistä määritettiin RNA-pitoisuudet fluorometrisesti (Qubit<sup>TM</sup> Fluorometer, Invitrogen, USA ja Quant-iT<sup>TM</sup> RNA Assay Kit, Invitrogen, USA). Käänteistranskriptioon käytettiin RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit:iä (Fermentas, EU). Käänteistranskriptio tehtiin valmistajan ohjeen mukaan. Ohjeessa oli annettu soveltuvaksi templaatti-RNA:n määräksi totaali-RNA:n tapauksessa 10 ng – 5 µg. Sopiva templaatti-RNA:n määrä saatiin fluorometristen totaali-RNA määritysten perusteella. Käänteistranskription alukkeina käytettiin satunnaisia heksameerialukkeita. Käänteistranskription onnistumisen tarkastamiseksi qPCR:llä käänteistranskriptioitiin positiivisia kontroleja käyttäen RevertAid<sup>TM</sup> H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit:in tarjoamaa kontrollia (GAPDH RNA).

## 11.9 Tutkittavat geenit

Tutkittavaksi valittiin 6 geeniä, joiden oletettiin kirjallisuuden perusteella antavan vasteita ulkoisen pH:n muutokseen. Kirjallisuussiosiossa on selvitetty tarkemmin näiden geenien konteksti. Lisäksi valittiin vertailugeeniksi *ldhD*, LGG\_00158. Taulukossa 5 on esitetty tutkimukseen valitut geenit.

**Taulukko 5.** Tutkimukseen valitut geenit. Geenien ortologia haettu lähteestä (Kanehisa *et al.*, 2008).

Geenin nimi	Ortologia
<i>hrcA</i> , LGG_01606	Lämpöindusoidun transkription repressor
<i>aldB</i> , LGG_01898	Asetolaktaattidekarboksylaasi
<i>cfa</i> , LGG_02109	Syklopropanirasva-asyylifosfolipidisyntaasi
<i>atpA</i> , LGG_01181	F-tyypin vetytransportteri, ATPaasin $\alpha$ -alaysikkö
<i>pstS</i> , LGG_00906	Fosfaattitransportterin substraatin sitova proteiini
<i>ldhD</i> , LGG_00158	D-laktaattidehydrogenaasi
<i>groEL</i> , LGG_02239	kaperoni, GroEL

## 11.10 Geeniekspressiotasojen määrittäminen qPCR:llä

Geenien suhteellisen ekspression määrittämiseen qPCR:llä käytettiin MyiQ<sup>TM</sup> Single Color Real-Time PCR Detection System:iä (Bio-Rad, USA). Laitetta ohjattiin tietokoneella käyttäen valmistajan tarjoamaa ohjelmaa (iQ5<sup>TM</sup> Optical System Software, Bio-Rad, USA). qPCR:ssä käytettiin SYBR Green -värjäystä (Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Fermentas, EU) 96-kaivoisilla levyillä. Reaktiotilavuutena oli 25  $\mu$ l. Yksittäisen kaivon reaktioseoksen koostumus oli 12,5  $\mu$ l Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix:iä, 3  $\mu$ l F-aluketta (2,5  $\mu$ M), 3  $\mu$ l R-aluketta (2,5  $\mu$ M) ja 6,5  $\mu$ l käänteistranskriptiosta saatua laimennettua cDNA-näytettä.

### 11.10.1 Alukkeiden suunnittelu qPCR:lle

Kohdegeeneille suunniteltiin alukkeet käyttäen Primer3-ohjelmaa (Rozen ja Skaletsky, 2000). Ohjelmalla saaduista alukepariehdokkaista valittiin parhaita vaikuttavat hyödyntäen LGG:n genomidataa tietokannasta (Baker *et al.*, 2000) ja sen tarjoamaa BLAST-sekvenssinlinjausalgoritmiä. Alukkeiden (Sigma, USA) monistustuotteiden spesifisyys varmistettiin qPCR:n sulamiskäyräanalyysillä. Taulukossa 6 on esitetty DNA-sekvenssiä 5'→3'-suuntaan monistavat F-alukkeet ja sekvenssiä 3'→5'-suuntaan monistavat R-alukkeet sekä näiden monistustuotteiden pituudet.



**Taulukko 6.** qPCR:n yhteydessä käytetyt geenispesifit alukkeet.

Kohdegeeni	F-aluke (5'→3')	R-aluke (3'→5')	Tuotteen pituus (nt*)
<i>hrcA</i> , LGG_01606	CGTGAAGTAGCCACGATCAA	TTTCAGGAACGGTGAAAACC	244
<i>aldB</i> , LGG_01898	GCCATCTTATCCGACCTTGA	TGATCAGCAGCCAGAAAATG	153
<i>cfa</i> , LGG_02109	ATTCCGGTATGCAGTTGGAC	TTGCAGGTAAACATCCCACA	152
<i>atpA</i> , LGG_01181	GGCGTTAAACCTTGAAACGA	ACACGGATTGACGTTGCATA	242
<i>pstS</i> , LGG_00906	AATCGCTGGCATATCTGGTC	AATCTGGCCACTGGCATTAC	177
<i>ldhD</i> , LGG_00158	CGATCATCCGGACTTTGAAT	ATCGCCTGGGTATCAATCAG	186
<i>groEL</i> , LGG_02239	ATGATATTGCCGGTGATGGT	CCGTAAACCTTGTGGCTGAT	175

\*nt = nukleotidiä

### 11.10.2 qPCR-ajojen toteutus ja lämmitysprotokolla

Kasvatusnäytteiden analysointiin qPCR:llä käytettiin yhteensä yhdeksän 96-kaivoista levyä. Taulukossa 7 on esitetty kullakin levyllä ajettut näytteet, sekä niissä käytetyt kontrollit. NTC (engl. no template control) tarkoittaa kontrollia, johon ei ole lisätty templaatti-DNA:ta. Tällä seurataan mahdollisia reagenssien kontaminoitumisia DNA:lla. NTC-kontrolleissa vaihdeltiin käytettyjä alukkeita eri ajojen välillä. NC (engl. negative control) tarkoittaa kontrollia, jossa käytetään templaatti-DNA:n sijasta käänteistranskriptoimatonta RNA:ta. Tällä seurataan genomisen DNA:n aiheuttamaa kontaminaatiota eli kuinka hyvin DNAasi-käsittely on onnistunut. PC (engl. positive control) tarkoittaa kontrollia, jossa käytetään templaatti-DNA:na standardi-RNA:sta käänteistranskriptoitua cDNA:ta. Tällä seurataan käänteistranskription onnistumista.

Näytteet pipetoitiin levyihin tripleteinä, siten että rinnakkaiset näytteet olivat rinnakkaisia jo näytteenottovaiheesta lähtien eli virheeseen summautui eri käsittelyvaiheiden aiheuttama virhe. SYBR Green -menetelmä värjäyksessä ei ole spesifi, vaan fluorofoori sitoutuu kaikkeen monistuneeseen tuotteeseen. Tämän vuoksi eri geenien ekspression analysointi mahdollistettiin pipetoimalla kullekin näytteelle jokaiselle tutkittavalle geenille oma tripletti. Näissä käytettiin geenispesifejä alukkeita. Scale-down-kasvatuksen näytteiden ajossa jokaisessa levyssä käytettiin vertailunäytteinä

**Taulukko 7.** Näytteiden järjestäytyminen qPCR:ssä ajetuille levyille.

Levy	Näytteet	Kontrollit
levy 1	<b>Panoskasvatukset</b> laboratorioravintoalusta	NTC, PC, NC
levy 2	teollinen ravintoalusta (jälkimmäinen eksponenti- aalivaihe ja stationäärivaihe)	NTC
levy3	teollinen ravintoalusta (aiempi stationäärivaihe)	NTC
levy 4	<b>Scale-down-kasvatus</b> kemostaattikoe, PFR-koe, NaCl-koe, koe 1	NTC, PC, NC
levy 5	NaCl-koe, koe 2, koe 3, koe 4	NTC, PC, NC
levy 6	NaCl-koe, koe 5, koe 6, koe 7	NTC, PC, NC
levy 7	NaCl-koe, koe 8, koe 9, koe 10	NTC, PC, NC
levy 8	NaCl-koe, koe 11	NTC, PC, NC
levy 9	<b>Happostressikoe</b> alkunäyte, stimuloitu näyte, vertailunäyte	NTC, NC

NaCl-kokeen näytteitä levyjen välisen vertailtavuuden mahdollistamiseksi.

PCR-ajon reaktioiden lämpötilojen säätöön käytettiin kolmivaiheista protokollaa. Taulukossa 8a on esitetty näytteiden monistamiseen käytetty protokolla. Alukkeiden spesifisyyden määrittämiseen (Liite A) käytetyssä sulamiskäyräanalyysissä käytettiin protokollan lisänä taulukon 8b esittämiä vaiheita.

### 11.10.3 qPCR-datan käsittely

Kunkin levyn datalle tehtiin taustan erotus, perustason erotus ja käyrän sovitus käyttäen valmistajan tarjoamaa ohjelmaa (iQ5<sup>TM</sup> Optical System Software, Bio-Rad, USA). Suhteellinen ekspressio vertailugeenin ja vertailunäytteen suhteen saatiin vähentämällä ensin kunkin näytteen vertailugeenin  $C_T$ -arvosta kunkin kohdegeenin  $C_T$ -arvo,

$$\Delta C_{T,n,k,\text{kohde geeni}} = C_{T,n,k,\text{ldhD}} - C_{T,n,k,\text{kohde geeni}}, \quad (5)$$

missä  $n$  viittaa näytteeseen ja  $k$  tripletin jäseneseen. Tripleteistä laskettiin keskiarvo

**Taulukko 8.** a) PCR-reaktioiden lämpötilojen säätöön käytetty protokolla. b) Sulamiskäyräanalyysiä varten käytetty lisäprotokolla.

<b>a) PCR-vaihe</b>			
1x	alustava denaturointi	95 °C	10 min
40x	denaturointi	95 °C	15 s
	pariutuminen (engl. annealing)	60 °C	30 s
	ketjujen pidennys	72 °C	30 s*
<b>b) Sulamiskäyrä-vaihe</b>			
1x	denaturointi	95 °C	1 min
1x	pariutuminen	60 °C	1 min
71x	sulamiskäyrä	60 °C ... 0,5 ... 95 °C	30 s**

\*vaihe, jossa fluoresensseistä otettiin kuva

\*\*vaihe, jossa fluoresensseistä otettiin kuva 0,5 °C välein joka 30 s

$$\Delta \bar{C}_{T,n,kohde\ geeni} = \frac{1}{3} \sum_{k=1}^3 \Delta C_{T,n,k,kohde\ geeni} \quad (6)$$

Kullekin levyille valittiin vertailunäyte, joihin muita levyn näytteitä verrattiin. Muiden näytteiden suhteelliset muutokset vertailunäytteeseen nähden saatiin yhtälöstä

$$\text{referenssiin verrattu suhdeluku} = \frac{2^{\Delta \bar{C}_{T,n,kohde\ geeni}}}{2^{\Delta \bar{C}_{T,referenssi,kohde\ geeni}}} = N. \quad (7)$$

Tälle menetelmälle laskettiin keskihajonnat,  $SD$ , seuraavasti

$$SD_N = N \cdot \sqrt{\left( \frac{SD(\Delta C_{T,referenssi,kohde\ geeni})}{\Delta \bar{C}_{T,referenssi,kohde\ geeni}^2} \right)^2 \cdot \left( \frac{SD(\Delta C_{T,n,kohde\ geeni})}{\Delta \bar{C}_{T,n,kohde\ geeni}^2} \right)^2}, \quad (8)$$

missä  $N$  on vertailukohteeseen verrattu suhdeluku.

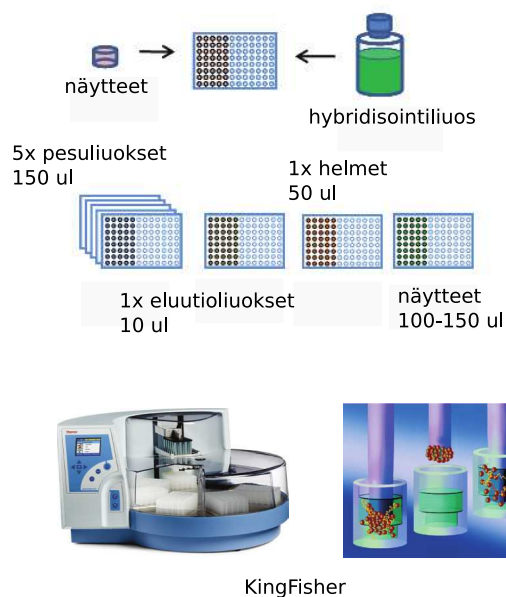
### 11.11 Geeniekspressiotasojen määritykset TRAC:illa

TRAC-menetelmää varten käytettiin suoraan näytteitä, joista solut oli hajotettu, eristämättä RNA:ta. Solujen hajotuksessa näytteisiin lisättiin 100 µl lasihelmiä (Glass Beads 106 microns and finer (acid washed), Sigma, USA) ja 100 µl hajotuspuskuria (TRACKPACK™ Lysis Buffer, PlexPress, Suomi). Näyteputkia ajettiin 2 minuuttia Disruptor Genie-laitteessa (Scientific Industries<sup>INC</sup>, USA).

PlexPress Oy toteutti varsinaiset TRAC-ajot. Tässä on kuvattu käytetty protokolla pääpiirteissään. Osa kuvauksesta on omaksuttu lähteistä (Rautio ja Suoma-

lainen, 2009; Rautio *et al.*, 2006a). Näytteet, joista solut oli hajotettu, siirrettiin 96-kaivoiselle levyille (ABgene, Epsom, UK). Kaivoihin lisättiin hybridisaatiopuskuria 100 µl, joka sisälsi kaikille tutkittaville geeneille kahdet spesifit koettimet sekä  $5 \times \text{SSC}$  (750 mM NaCl, 75 mM natriumsitraatti), 0,2% natriumlauryylisulfaattia (SDS),  $1 \times \text{Denhardt}$  (0,02% Ficoll, 0,02% polyvinyylipyrrolidonia, 0,02% BSA) ja 3% dekstraanisulfaattia. Toinen koettimista oli leimattu biotiinilla ja toinen FAM-fluoroforilla. Hybridisointi tehtiin 60 °C:ssa 30–120 minuuttia 600 rpm ravistelussa (Thermomixer Comfort, Eppendorf, Saksa).

Hybridisointia seuranneet affiniteettisieppaus- (engl. affinity capture), pesu- ja eluointivaiheet oli automatisoitu (KingFisher 96, Thermo Electron, Suomi). Ohjelmoitu protokolla sisälsi seuraavat vaiheet: 1. Hybridisoitujen RNA-näytteiden affiniteettisieppaus 50 µg:aan streptavidinipäällysteisiä magneettihelmiä (MyOne DynaBeads, Dynal, Norja) huoneen lämmössä 30 minuutin ajan. 2. Helmet pestiin kolme kertaa 1,5 minuutin ajan 150 µl:ssa liuosta, joka sisälsi  $1 \times \text{SSC}$  ja 0,1% SDS huoneen lämmössä. 3. Pestiin kerran 1,5 minuutin ajan 150 µl:ssa liuosta, joka sisälsi  $0,5 \times \text{SSC}$  ja 0,1% SDS huoneen lämmössä. 4. Pestiin kerran 1,5 minuutin ajan 150 µl:ssa liuosta, joka sisälsi  $0,1 \times \text{SSC}$  ja 0,1% SDS huoneen lämmössä. 5. Koettimia eluoiitiin 10 µl:aan deionisoitua formamidia (Sigma) 20 minuutin ajan 37 °C:ssa. Kuvassa 13 on havainnollistettu menetelmän vaiheita.(Rautio *et al.*, 2006a)



**Kuva 13.** Havainnollistettu TRAC-protokolla. Kuva on muokattu lähteestä Rautio ja Suomalainen (2009).

Eluentit analysoitiin kapillaarielektroforeesilla (ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA). Koettimien identiteetit määritettiin migraatiokäyttäytymisen perusteella ja määrä piikin pinta-alan perusteella (Rautio *et al.*, 2006a). Data käsiteltiin Peak Scanner<sup>TM</sup>- (Applied Biosystems, USA) ja TRACProfiler-ohjelmalla

(PlexPress, Suomi). Geenien ekspressiotasot normalisoitiin käyttäen vertailugeeninä *ldhD*:tä (LGG\_00158) kuten qPCR:lläkin. qPCR-vertailuja varten geenien ekspressiot jaettiin vertailunäytteiden ekspressioilla.

### 11.11.1 TRAC:in laadunvarmistus

Kapillaarielektroforeesia varten geenikohtaisten oligonukleotidikoettimien migraatiokäyttäytyminen ja signaali-intensiteetti tarkastettiin. Varmistettiin, että kaikkien kohdegeenien ekspressiota voidaan analysoida samasta levyn kaivosta. Vaihtoehtoisia koettimia testattiin vertaillen saman kohteen signaali-häiriösuhdetta ja vertaillen kertaisteroja näytteiden välillä vertailudataan nähden.

Toistettavuutta seurattiin käyttäen kontrollia hybridisoinnissa ja kapillaarielektroforeesiajoissa. Kaikkiin näytteisiin lisättiin saman verran yksijuosteista DNA:ta ennen hybridisointia. Tätä kontrollia käytettiin määrittämään koko analyysin laatu ja poistamaan ei-biologinen vaihtelu datan normalisoinnissa. Ennen kapillaarielektroforeesia kaikkiin näytteisiin lisättiin sama määrä eri kokoisia oligonukleotideja kapillaarielektroforeesin laadun määrittämistä varten. Lisäksi varmistettiin, että kasvatuksesta saadut lysaatit olivat riittäviä menetelmää varten ja että eristetyistä RNA:sta saatu signaaliprofiili vastasi lysaatista saatua signaaliprofiilia.

## 11.12 Datan jälkianalyysi

Scale-down-kasvatuksen kokeista saadulle ekspressiodatalle tehtiin perusteellinen datan jälkianalyysi. Ensin dataa tarkasteltiin geneettäin, siten että data projisoitiin molempien muuttujien, lämpötilan ja pH-muutoksen suhteen. Näin voitiin karkeasti visualisoida yksittäisen muuttujan vaikutusta ekspressioon. Tutkittavien geenien ekspressioiden suhdetta lämpötilan ja pH:n muutokseen tarkasteltiin seuraavaksi sovitamalla mitattuun dataan erilaisia lineaarisia mallirakenteita käyttäen Matlab<sup>®</sup>-ohjelmistoa (Matlab<sup>®</sup> 7.0.4.365 (R14) Service Pack 2, The MathWorks Inc). Näissä sovituksissa käytettiin näytepisteistä mitattujen ekspressioiden keskiarvoja ja tarkasteltiin erilaisten mallirakenteiden mallin hyvyttä kuvaavia tunnuslukuja ( $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvoja). Näiden perusteella tehtiin huolellinen mallin muodostus ja mallin tunnuslukujen tarkastelu potentiaalisille geenin mallirakenteen yhdistelmille Modde-ohjelmalla (Modde 8.0.0.0, Umetrics AB).

Scale-down-kasvatuksen koesuunnitelman kokeista otettujen näytteiden geenien ekspressoitumista sovitettiin lineaarisiin regressiomalleihin, jotka ovat muotoa

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \boldsymbol{\varepsilon}. \quad (9)$$

Yhtälössä 9 on selitettävänä muuttujana  $\mathbf{y}$  ( $n \times 1$ -vektori).  $\mathbf{X}$  on selittävien muuttujien matriisi  $n \times p$ -matriisi,  $\boldsymbol{\beta}$  on regressiokertoimien  $p \times 1$ -vektori ja  $\boldsymbol{\varepsilon}$  on

satunnainen mallivirhe ( $n \times 1$  -vektori). Sovitusyritteissä käytettiin samankaltaisia mallirakenteita kuin Uuksulaisen (2010) työssä on käytetty haponsietokyvyille ja pakkaskestävyydelle. Erilaiset mallirakenteet, joita yritettiin sovittaa, on esitetty taulukossa 9. Mallien selittävinä muuttujina käytettiin pH:n muutosta bioreaktorin ja tulppavirtausreaktorin välillä ( $dpH$ ) ja tulppavirtausreaktorin lämpötilan (K) luonnollisen logaritmin käänteisarvoa ( $T$ ). Muodostetuissa malleissa viitataan symbolilla  $T \frac{1}{\ln(K)}$ , jossa  $K$  on lämpötila kelvineinä.

**Taulukko 9.** Erilaiset sovitetut mallirakenteet.  $\beta_{0-5}$  ovat mallien regressiokertoimet.

$y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_3 T + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \beta_5 dpH \cdot T + \varepsilon$ $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 dpH \cdot T + \varepsilon$
---

Mallirakenteita sovitettiin kaikille tutkittaville geeneille (*pstS*, *atpA*, *hrcA*, *aldB*, *cfa* ja *groEL*). Mallit generoitiin käyttäen Matlab<sup>®</sup>-ohjelmistoa ja koodia, joka on esitetty liitteessä E. Malleille ratkaistiin pienimmän neliösumman estimaatit

$$\hat{\beta} = (\mathbf{X}'\mathbf{X})^{-1}\mathbf{X}'\mathbf{y}. \quad (10)$$

Menetelmä on selvitetty tarkemmin lähteessä (Hoaglin ja Welsch, 1978). Sovite estimaateilla saadaan laskettua yhtälöstä

$$\hat{\mathbf{y}} = \mathbf{X}\hat{\beta}. \quad (11)$$

Mallien hyvyttä voidaan yrittää arvioida käyttäen  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvoja (Eriksson *et al.*, 2000).  $R^2$ -arvo kuvaa mallin sovituksen hyvyttä ja  $Q^2$ -arvo kuvaa mallin ennustavuuden hyvyttä.  $R^2$ -arvot vaihtelevat välillä 0–1.  $Q^2$  voi olla myös negatiivinen. Mitä vähemmän arvot poikkeavat arvosta 1 sen parempi malli. Generoiduille malleille määritettiin  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvot (Liite E).  $R^2$ -arvot voidaan määrittää malleille käyttäen lähteessä (Eriksson *et al.*, 2000) annettua yhtälöä

$$R^2 = \frac{SSE - SST}{SSE}, \quad (12)$$

missä

$$SSE = \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2 \quad (13)$$

ja

$$SST = \sum_i (y_i - \bar{y})^2. \quad (14)$$

$Q^2$ -arvot malleille saadaan määritettyä lähteen (Eriksson *et al.*, 2000) mukaan yhtälöllä

$$Q^2 = \frac{SSE - PRESS}{SSE}, \quad (15)$$

missä

$$PRESS = \sum_i \frac{(y_i - \hat{y}_i)^2}{(1 - h_i)^2}. \quad (16)$$

$h_i$  on matriisin,  $X(X'X)^{-1}X'$ , i. diagonaalelementti. Modde-ohjelmalla tehtiin perusteellisempi tarkastelu potentiaalisille geenien ja mallirakenteiden yhdistelmille ja määritettiin tunnusluvut muodostetuille malleille.

## 12 Tulokset ja tulosten tarkastelu

Tässä luvussa on esitetty tulokset ja niistä tehdyt päätelmät. Panoskasvatusten ja scale-down-kasvatuksen toteutumisesta on kuvattu lyhyesti. Tarkemmin nämä on esitelty Uuksulaisen (2010) työssä. Eri kasvatusten tulokset on esitelty, mutta jälkianalyysin pääpaino on asetettu scale-down-kasvatuksen koesuunnitelman kokeista saatuihin ekspressionäytteisiin suurimman näyteotoksen vuoksi. Koesuunnitelman kokeissa myös pakkaskestävyys- ja happostressianalyysien toteutus oli luotettavampi (Uuksulainen, 2010). Varsinaisten kokeiden lisäksi on vertailtu rinnakkaisia menetelmiä, TRAC:ia ja qPCR:ää, geeniekspression määrittämiseen.

### 12.1 RNA:n käsittely qPCR:ää varten

Panoskasvatuksista otetuissa näytteissä oli pääsääntöisesti enemmän soluja, ja niistä saatiin eristettyä enemmän RNA:ta kuin scale-down-kasvatuksen näytteistä. Panoskasvatustenäytteistä eristetyn RNA:n saanto vaihteli välillä 0,78–132,00 µg. Scale-down-kasvatuksesta otetuissa näytteissä eristetyn RNA:n saanto vaihteli välillä 2,52–22,10 µg. Näytteistä saadut RNA-saannot on esitetty liitteessä C.

Eri esikäsittelyvaiheiden onnistumista seurattiin qPCR-ajoissa kontrollien avulla. Kontrollissa seurattiin mahdollista reagenssien kontaminoitumista DNA:lla (NTC), genomisen DNA:n aiheuttamaa kontaminaatiota (NC) ja käänteistranskription onnistumista (PC). Panoskasvatuksista saadut näytteet käsiteltiin ensin. Näiden qPCR-ajoissa NTC-kontrolli ei monistunut merkittävästi, PC-kontrolli monistui ja NC-kontrolli monistui merkittävästi. NC-kontrollin monistuminen on ei-toivottavaa ja tarkoittaa, että DNAasi-käsittely ei ole onnistunut toivotulla tavalla. Näihin näytteisiin jäi siis genomista DNA:ta, joka osaltaan aiheuttaa virhettä qPCR:n monistustuotteista saatuaan signaaliin. Scale-down-kasvatuksen näytteiden käsittelyä varten DNAasi-käsittely varmistettiin toimivaksi muuttaen protokollaa ja käsittelyyn käytettävää kittiä. Näiden näytteiden qPCR-ajoissa NTC- ja NC-kontrollit eivät monistuneet merkittävästi. Sen sijaan PC-kontrolli monistui.

### 12.2 TRAC- ja qPCR-tulosten vertailu

Tämän työn yhtenä tavoitteena oli vertailla TRAC:in ja qPCR:n tulosten yhdenmukaisuutta. qPCR-tuloksissa ilmeni huomattavaa hajontaa rinnakkaisten näytteiden välillä, minkä vuoksi näiden tulosten luotettavuus kärsii varsinkin kasvatuseolosuhteiden muutosten ollessa pieniä kuten scale-down-kasvatuksessa tehdyissä koesuunnitelman kokeissa. Tällöin suhteelliset muutokset geenien ekspressoitumisissa ovat vähäisiä ja virheen osuus kasvaa. Kuvissa 14 ja 15 on esitetty laboratorioravintoalustalla ja teollisella ravintoalustalla tehtyjen panoskasvatusten geeniekspressiotulokset rinnakkain TRAC:illa ja qPCR:llä. Näissä kuvissa ja myöhemmin eri kasvatusten kasvuvaiheisiin on viitattu lyhenteillä, jotka on selitetty taulukossa 10.

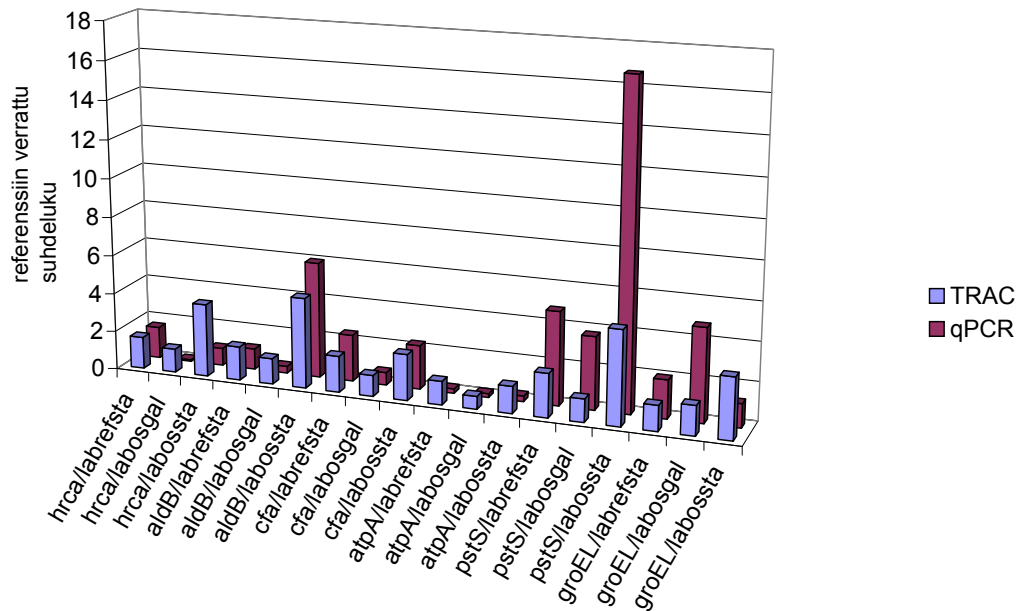


**Taulukko 10.** Panoskasvatusten eri vaiheista käytetyt lyhenteet.

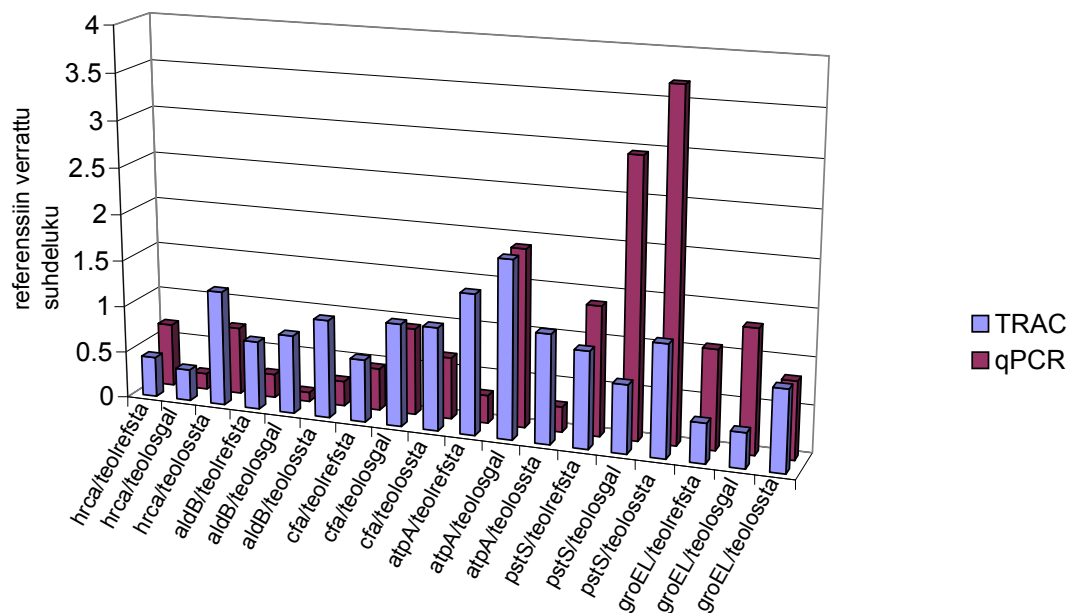
Lyhenne	Viittaus
labrefgal	laboratorioravintoalustan vertailukasvatuksen jälkimmäinen eksponentiaalisien kasvun vaihe
labrefsta	laboratorioravintoalustan vertailukasvatuksen stationäärivaihe
laboseks	laboratorioravintoalustan vertailukasvatuksen ensimmäinen eksponentiaalisien kasvun vaihe
labosgal	laboratorioravintoalustan pH-oskillointikasvatuksen jälkimmäinen eksponentiaalisien kasvun vaihe
labossta	laboratorioravintoalustan pH-oskillointikasvatuksen stationäärivaihe
teolrefeks	teollisen ravintoalustan vertailukasvatuksen ensimmäinen eksponentiaalisien kasvun vaihe
teolrefgal	teollisen ravintoalustan vertailukasvatuksen jälkimmäinen eksponentiaalisien kasvun vaihe
teolrefsta	teollisen ravintoalustan vertailukasvatuksen stationäärivaihe
teoloseks	teollisen ravintoalustan pH-oskillointikasvatuksen ensimmäinen eksponentiaalisien kasvun vaihe
teolosgal	teollisen ravintoalustan pH-oskillointikasvatuksen jälkimmäinen eksponentiaalisien kasvun vaihe
teolossta	teollisen ravintoalustan pH-oskillointikasvatuksen stationäärivaihe

Laboratorioravintoalustan kasvatuksissa geeniekspressiomuutokset olivat suurimpia, jolloin hajonnan osuus on suhteessa pienempi, minkä vuoksi tulokset korreloivat parhaiten TRAC:in ja qPCR:n välillä. Pearson-korrelaatio menetelmien välillä oli näissä kokeissa 0,68. Teollisella ravintoalustalla suhteelliset geeniekspressiomuutokset ovat pienempiä ja korrelaatio on huomattavasti huonompi 0,18. Korrelaatiovertailusta oli teollisen ravintoalustan kohdalla jätetty huomioimatta näytteet ensimmäisestä eksponentiaalisien kasvun vaiheesta. Scale-down-kokeissa korrelaatio on myös huono suhteellisten geeniekspressiomuutosten ollessa vähäisiä kokeiden välillä. Näissä kokeissa Pearson-korrelaatio TRAC:in ja qPCR:n välillä oli 0,48. Kuvassa 16 on esitetty geeniekspressiot TRAC:illa ja qPCR:llä geneittain scale-down-kokeista.

Huolimatta huonoista korrelaatioista ekspressiomuutosten suuruusluokka säilyy menetelmien välillä melko hyvin. Menetelmien vertailussa qPCR-tuloksien hajontaa on pyritty siistimään poistamalla käytetyistä kolmesta rinnakkaisesta näytteestä eniten kahdesta muusta poikkeavia kynnysarvoja. Tästä huolimatta hajonta on huomattavaa. Liitteessä B on esitetty qPCR-tulosten raakadata panoskasvatuksista ja



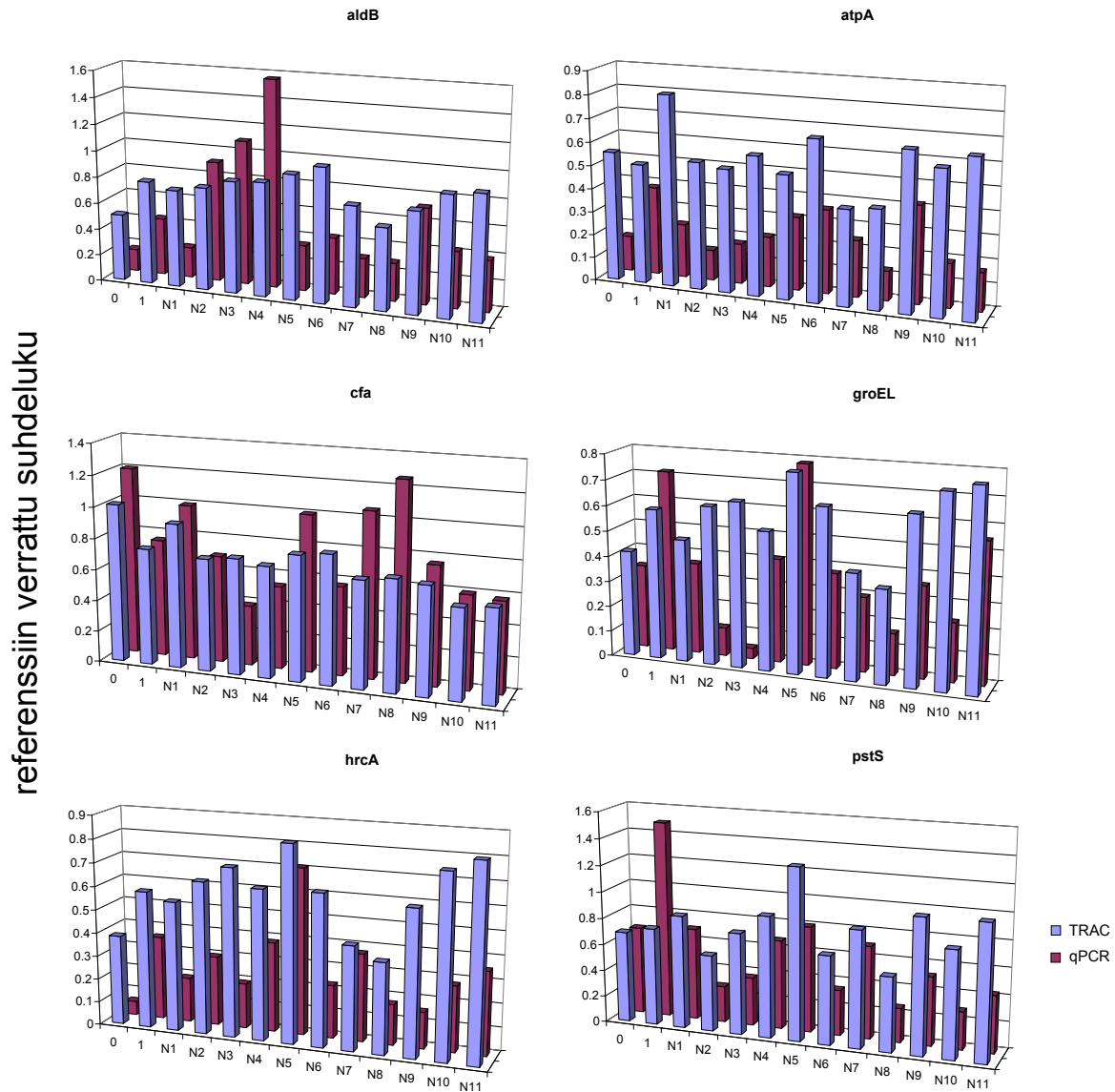
**Kuva 14.** Laboratorioravintoalustalla tehtyjen panoskasvatusten geeniekspressiot TRAC:illa ja qPCR:llä mitattuina.



**Kuva 15.** Teollisella ravintoalustalla tehtyjen panoskasvatusten geeniekspressiot TRAC:illa ja qPCR:llä mitattuina.

scale-down-kasvatuksesta sekä tulokset hajontoiin. Näytteiden  $C_T$ -arvot qPCR:llä vaihtelivat välillä 5,2–21,2.  $C_T$ -arvot olivat pääsääntöisesti väliltä 10–20.

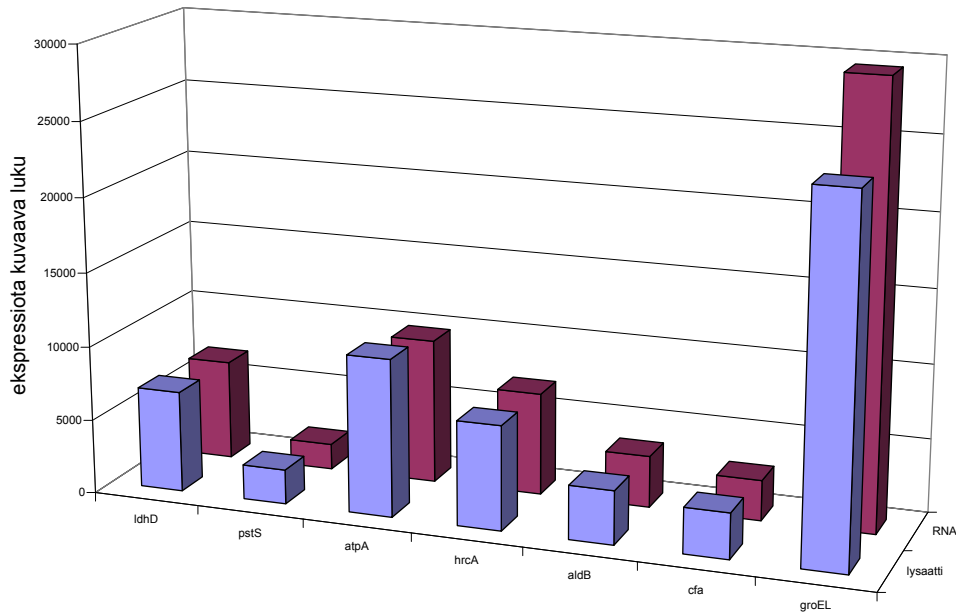
TRAC-tulosten rinnakkaisten näytteiden välinen hajonta on huomattavasti pienempää verrattuna qPCR:ään. Liitteessä D on esitetty raakadata TRAC-analyyseistä.



**Kuva 16.** Scale-down-kokeiden geeniekspressiot geneittäin TRAC:illa ja qPCR:llä mitattuina.

Tulosten analysoinnissa on käytetty vain TRAC-tuloksia lukuun ottamatta happo-stressikokeen geeniekspressioita, jotka määritettiin pelkästään qPCR:llä. qPCR:ssä esiintynyt hajonta johtuu mahdollisesti käänteistranskription toteutuksesta. Käänteistranskriptiossa käytettiin heksameerisiä satunnaisia alukkeita, joiden käyttö voi Nolan *et al.* (2006) mukaan aiheuttaa virhettä. TRAC:issa ja qPCR:ssä esikäsittelyvaiheet erosivat toisistaan siten, että TRAC:issa ei tarvinnut käyttää eristettyä RNA:ta vaan voitiin käyttää suoraan solulysaatteja. Solulysaatista ja eristetyistä RNA:sta saatujen signaalien yhtenevyys kuitenkin varmistettiin TRAC:ille (kuva 17). Kuvassa 17 käytetty näyte on laboratorioravintoalustalla tehdystä pH-oskillointi -kasvatuksesta stationäärivaihetta edeltävästä eksponentiaalisesta kasvuvaiheesta. Lysaatille kuvatut arvot ovat kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvot

ja RNA:lle kuvatut arvot ovat kahden rinnakkaisen näytteen keskiarvot. Signaalit olivat hyvin yhteneviä, mikä viittaisi siihen että myös qPCR:n tapauksessa RNA-eristys- ja käsittelyvaiheiden aiheuttamat virheet olisivat vähäisiä, koska käytetty eristysprotokolla oli sama.



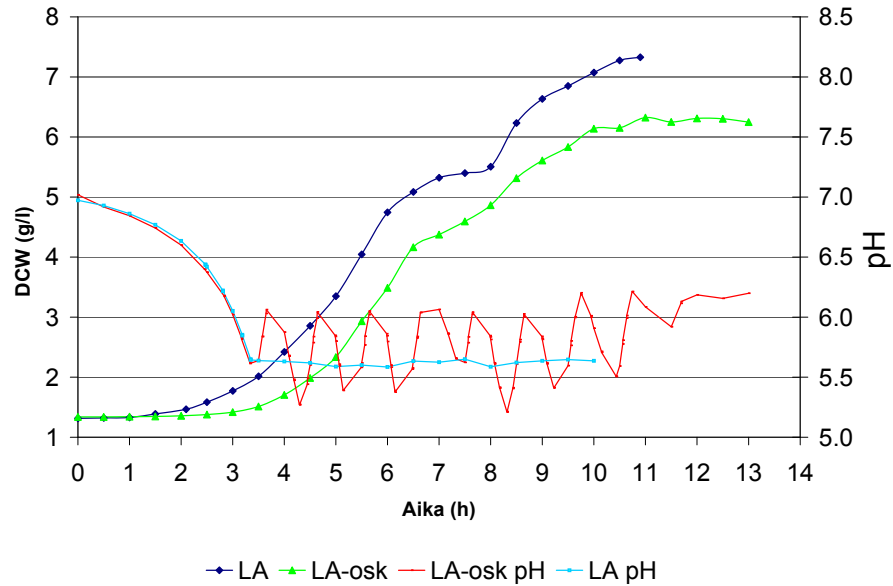
**Kuva 17.** Rinnakkaisten RNA- ja lyaattinäytteiden vertailua TRAC:illa.

Toinen mahdollinen virhelähde qPCR-tuloksiin voi olla vaihteleva totaali-RNA:n määrä rinnakkaisten näytteiden välillä. Ståhlberg *et al.* (2004) mukaan qPCR:ssä eri geenien  $C_T$ -arvot eivät muutu välttämättä lineaarisesti totaali-RNA:n muutoksen suhteen. Toisaalta tässä työssä näytteiden välillä totaali-RNA:n vaihtelu oli enimmäkseen pientä, jolloin lineaarisuusoletuksen ei pitäisi aiheuttaa kovin paljon virhettä.

## 12.3 Panoskasvatusten geeniekspressiot

Kaksi kasvatusta toteutettiin laboratorioravintoalustalla, joista toinen oli vertailukasvatus ja toisessa ravintoalustan pH säädettiin oskilloimaan. Kuvassa 18 on esitetty kasvukäyrät ja toteutuneet pH-arvot. Näytteet geeniekspressiotutkimuksia varten otettiin vertailukasvatuksesta laboratorioravintoalustalla kohdista 8 h ja 10 h. pH-oskillointikasvatuksesta laboratorioravintoalustalla näytteet geeniekspressiotutkimuksia varten otettiin kohdista 9 h ja 11 h. Näytteenoton ajanhetket eivät ole samat kasvatusten välillä, koska tarkoituksena oli ottaa näytteet vastaavista kasvun vaiheista ajanhetken sijaan.

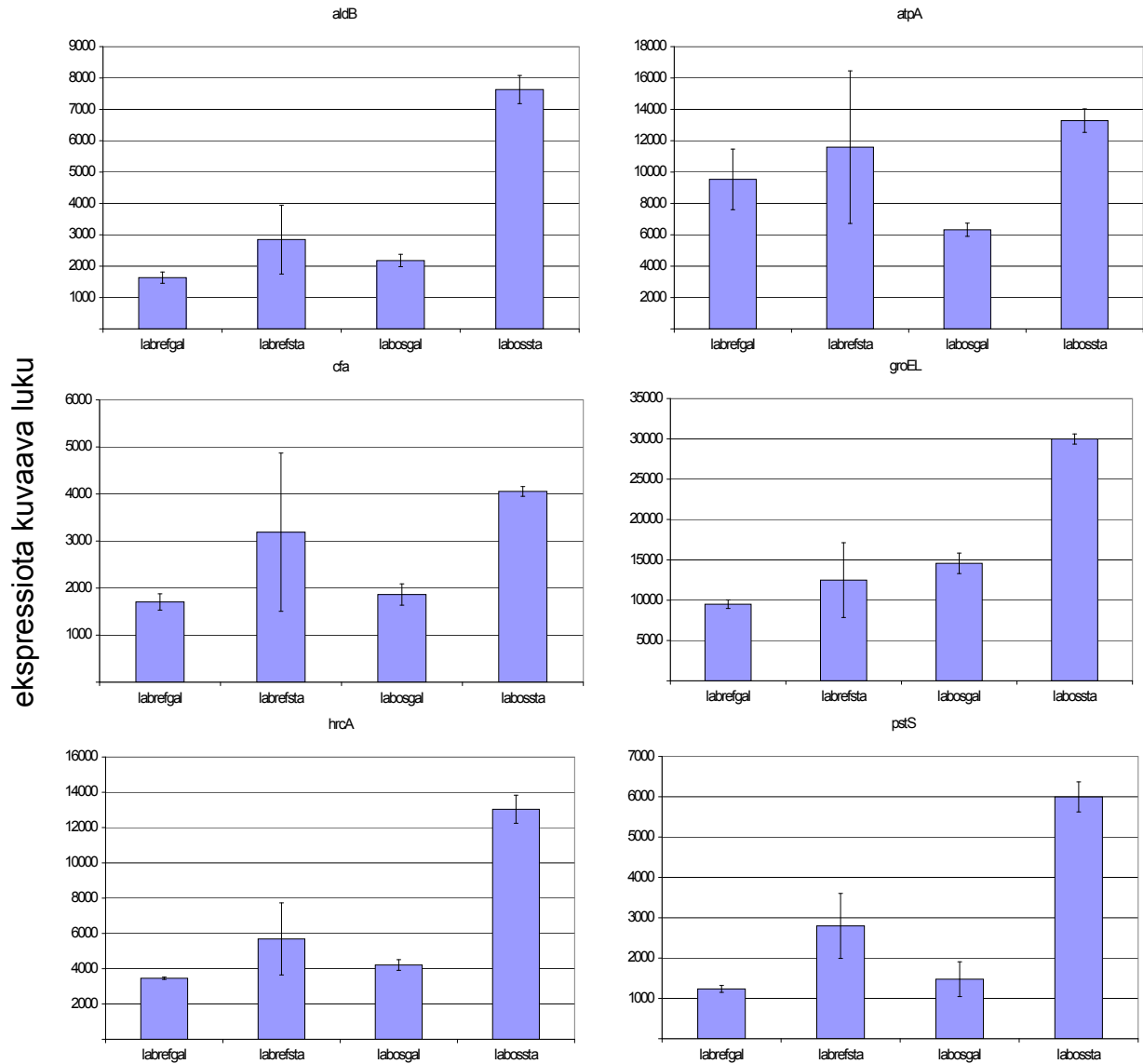
Kuvassa 19 esitettyjen laboratorioalustakasvatuksista saatujen TRAC-tulosten perusteella näyttäisi siltä, että tutkittujen geenien ekspressio on pääsääntöisesti kas-



**Kuva 18.** Laboratorioravintoalustalla tehtyjen panoskasvatusten solukonsentraatiot (DCW) ja toteutunut pH kuvan oikeassa laidassa. Kuvassa (LA) viittaa vertailukasvatukseen ja (LA-osk) oskillointikasvatukseen (Uuksulainen, 2010).

vanut stationäärivaiheessa. Tämä vastaa aiemmin raportoituja havaintoja (Wang ja Cronan, 1994; Koskenniemi *et al.*, 2009; Fischer *et al.*, 2006; Axelsson, 2004). Kuvan 19 kasvuvaiheiden lyhenteet on selitetty taulukossa 10. Ekspressiot ovat järjestelmällisesti moninkertaisia pH-oskillointikasvatuksen stationäärivaiheessa verrattuna vertailukasvatuksen stationäärivaiheeseen, mikä viittaisi siihen että pH-oskillointi saattaisi tehostaa proteiinisynteesiä stationäärivaiheessa. Toisaalta näytekohta pH-oskillointikasvatuksesta näyttäisi kuvan 18 perusteella edenneen hieman pidemmälle stationäärivaihetta, mikä saattaa vaikuttaa ekspressioeroihin. Vaiheet, joissa metabolia siirtyy galaktoosiin käyttöön, eivät juurikaan eroa ekspressioiltaan pH-oskillointi kasvatuksen ja vertailukasvatuksen välillä.

Huomattavimmat ekspressiomuutokset ovat geneillä *aldB* ja *pstS*. Molempien ekspressiot ovat noin nelinkertaisia pH-oskillointikasvatuksen stationäärivaiheessa edeltävään eksponentiaalivaiheeseen verrattuna. Molempien ekspressio on kohonnut hieman myös vertailukasvatuksen stationäärivaiheessa. Kirjallisuuden mukaan *pstS*-geenin ekspressoituminen kasvaa ravintoalustan fosfaatin vähentyessä ja pH:n kasvaessa (Fischer *et al.*, 2006). *pstS*-geenin kohonnut ekspressio voisi selittyä osaltaan fosfaatin loppumisesta stationäärivaiheessa ja osaltaan siitä, että näytteenottohetkellä pH-oskillointi on saavuttanut huippuarvonsa (kuva 18). Kirjallisuuden mukaan alhainen pH, ilmastus ja alhainen sokerikonsentraatio kasvuympäristössä suosivat diasetyyli/asetoini-reittiä, johon *aldB*-geenin ekspressoituminen liittyy (Axelsson, 2004). *aldB*-geenin ekspressoituminen voisi selittyä stationäärivaiheen alhaisella sokerikonsentraatiolla. Toisaalta pH-oskillointikasvatuksen stationäärivaiheessa *aldB*-

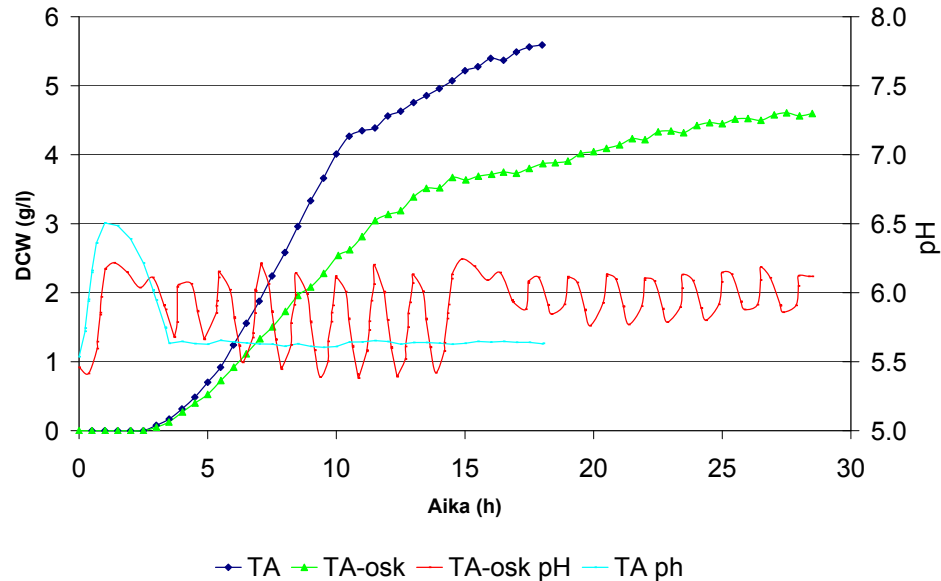


**Kuva 19.** Laboratorioravintoalustalla tehtyjen panoskasvatusten geeniekspressiotulokset TRAC:illa mitattuina. Ekspressiot on normalisoitu vertailugeenillä (*ldhD*).

geeniä on ekspressoitunut huomattavasti enemmän kuin vertailukasvatuksen stationäärivaiheessa. Geenien *pstS* ja *aldB* lisäksi yleisien stressigeenien *hrcA*:n ja *groEL*:in ekspressiot ovat koonneet huomattavasti pH-oskillointikasvatuksen stationäärivaiheessa. Myös *cfa*-geenin ekspressio on kohonnut stationäärivaiheessa. *atpA*-geenin ekspressio on muuttunut vähiten näytteiden välillä.

Teollisella ravintoalustalla tehtiin kaksi panoskasvatusta, joista toinen oli vertailukasvatus ja toinen pH-oskillointikasvatus. Kuvassa 20 on esitetty teollisella ravintoalustalla tehtyjen kasvatusten kasvukäyrät ja toteutuneet pH:t. Geeniekspressiönäytteitä otettiin vertailukasvatuksesta teollisella ravintoalustalla ajanhetkiltä 5,5

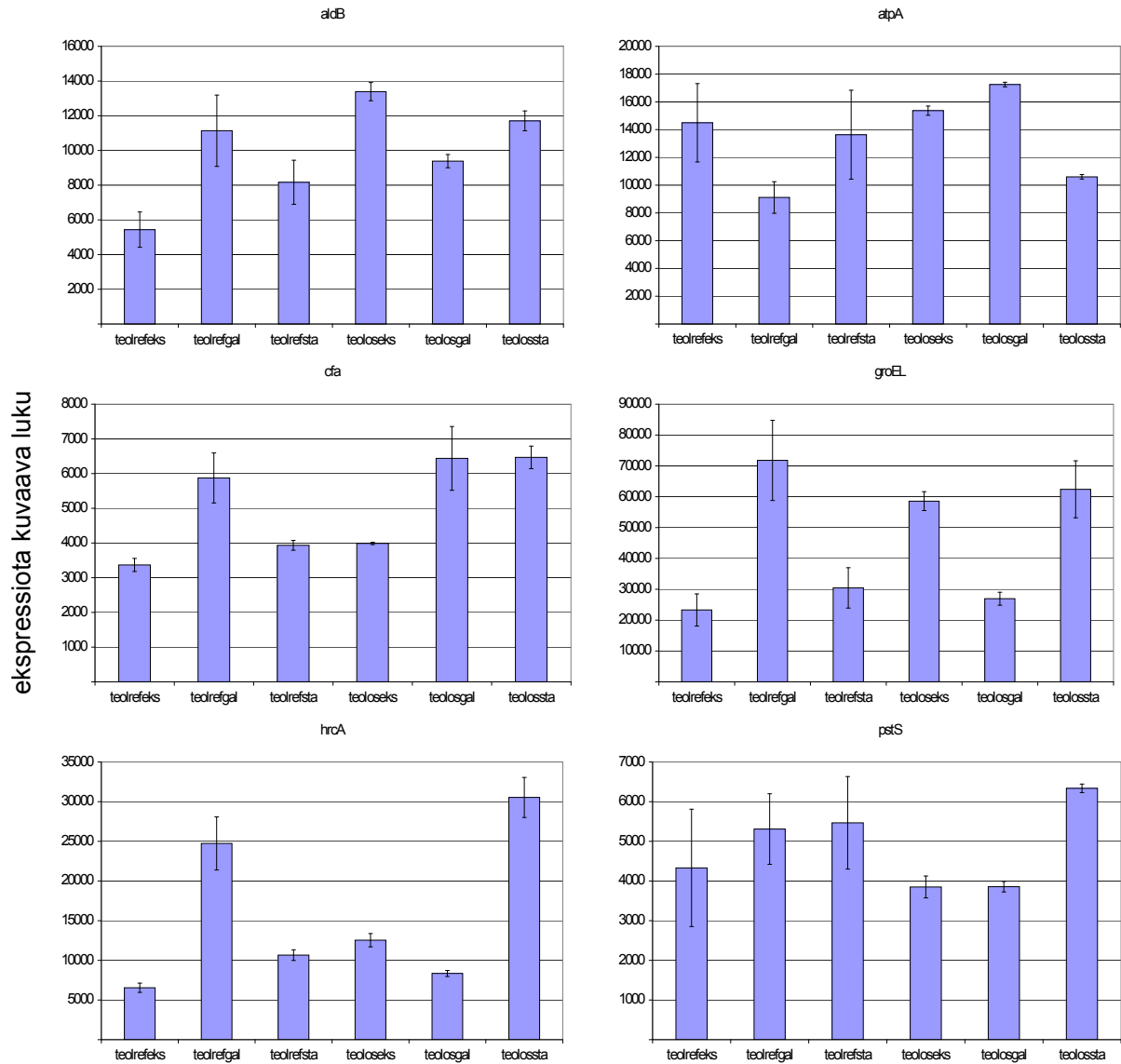
h, 11,5 h ja 17,0 h. pH-oskillointikasvatuksesta otettiin näytteitä ajanhetkiltä 5,5 h, 13,5 h ja n. 35 h. Ajanhetki 35 h ei näy kuvassa 20, mutta kasvatusta jatkui hieman kuvattua kauemmin.



**Kuva 20.** Teollisella ravintoalustalla tehtyjen panoskasvatusten solukonsentraatiot (DCW) ja toteutunut pH. TA viittaa vertailukasvatukseen ja TA-osk oskillointikasvatukseen (Uuksulainen, 2010).

Kuvassa 21 on esitetty teollisen ravintoalustan panoskasvatuksista saadut geeniekspressiotulokset TRAC:illa mitattuina. Kuvan 21 kasvuvaiheiden lyhenteet on selitetty taulukossa 10. Molemmilla teollisella ravintoalustalla tehdyissä panoskasvatuksissa tutkittujen geenien vertailugeeniin (*ldhD*) suhteutetut ekspressiot olivat pääsääntöisesti suurempia kuin laboratorioravintoalustalla tehtyjen kasvatusten vertailugeeniin suhteutetut ekspressiot. Tämä viittaisi näitä geenejä vastaavien proteiinien suurempaan synteesiin teollisella ravintoalustalla. Eri alustojen välillä näyttäisi olevan selvästi eroa tutkittujen geenien ekspressoitumiseen. Teollisella ravintoalustalla suhteelliset geeniekspressiomuutokset eri aikapisteiden välillä ovat pääsääntöisesti huomattavasti pienempiä kuin laboratorioravintoalustan näytteiden välillä.

Teollisella ravintoalustalla ei ilmennyt säännönmukaista geenien ekspression kasvua stationäärivaiheessa kuten laboratorioravintoalustan kasvatuksissa. Sitä vastoin vertailukasvatuksessa teollisella ravintoalustalla vaiheessa, jossa metabolia on vaihtunut galaktoosiin kulutukseen ja eksponentiaalinen kasvu on alkanut uudestaan, stressigeenit *hrcA* ja *groEL* sekä *cfa* ovat ekspressoituneet huomattavasti muihin aikapisteisiin verrattuna. Aiemmin todettiin, että kirjallisuuden mukaan stressigeenien kuten muiden tässä tutkittujen geenien ekspressoituminen kasvaa yleisesti stationäärivaiheessa. Tässä näyttäisi kuitenkin olevan ravintoalustasta riippuvia eroja.



**Kuva 21.** Teollisella ravintoalustalla tehtyjen panoskasvatusten geeniekspressiotulokset TRAC:illa mitattuina. Ekspressiot on normalisoitu vertailugeenin (*ldhD*) suhteen.

Panoskasvatuksista otettiin vain muutama näyte eri kasvuvaiheista. Voi olla, että tutkitut geenit antaisivat vasteita suoraan pH-muutokselle korkeammalla taajuu-  
della, mikä selittäisi osittain että tulokset eivät ole konsistentteja alustojen välillä. Tämän tutkiminen vaatisi toisen tyyppisen koejärjestelyn. Osaltaan epävarmuutta panoskasvatusten tuloksissa lisää, että vertailugeeni ei ole täysin stabiili kasvuvaiheiden suhteen (Desroche *et al.*, 2005). Epävarmuustekijöistä huolimatta eri alustoilla näyttää olevan suuri vaikutus geeniekspressioprofiiliin.



## 12.4 Scale-down-kokeiden geeniekspressiot

Scale-down-kasvatuksessa tehtiin kolme esikoetta ja koesuunnitelman mukaiset kokeet. Esikokeet olivat koe pelkällä kemostaatilla, koe kemostaatilla, johon on liitetty tulppavirtausreaktori, ja NaCl-koe, jossa scale-down-kasvatukseen syötettiin NaCl:a. Ideana oli pitää suolakonsentraatio vakiona koesuunnitelman kokeissa ja NaCl-kokeessa scale-down-kasvatuksen suolakonsentraatio pidettiin samana kuin koesuunnitelman kokeissa ilman pH- tai lämpötilamuutoksia. Taulukossa 11 on esitetty toteutuneet pH:t ja lämpötilat koesuunnitelman kokeissa. Koesuunnitelman luonnissa on käytetty taulukossa 11 esitettyjä  $\ln(T)^{-1}$ -arvoja, joissa  $T$ :nä on käytetty celsiusasteita (Uuksulainen, 2010). Mallien sovituksissa on kuitenkin käytetty  $\ln(T)^{-1}$ -arvoja kelvineillä.

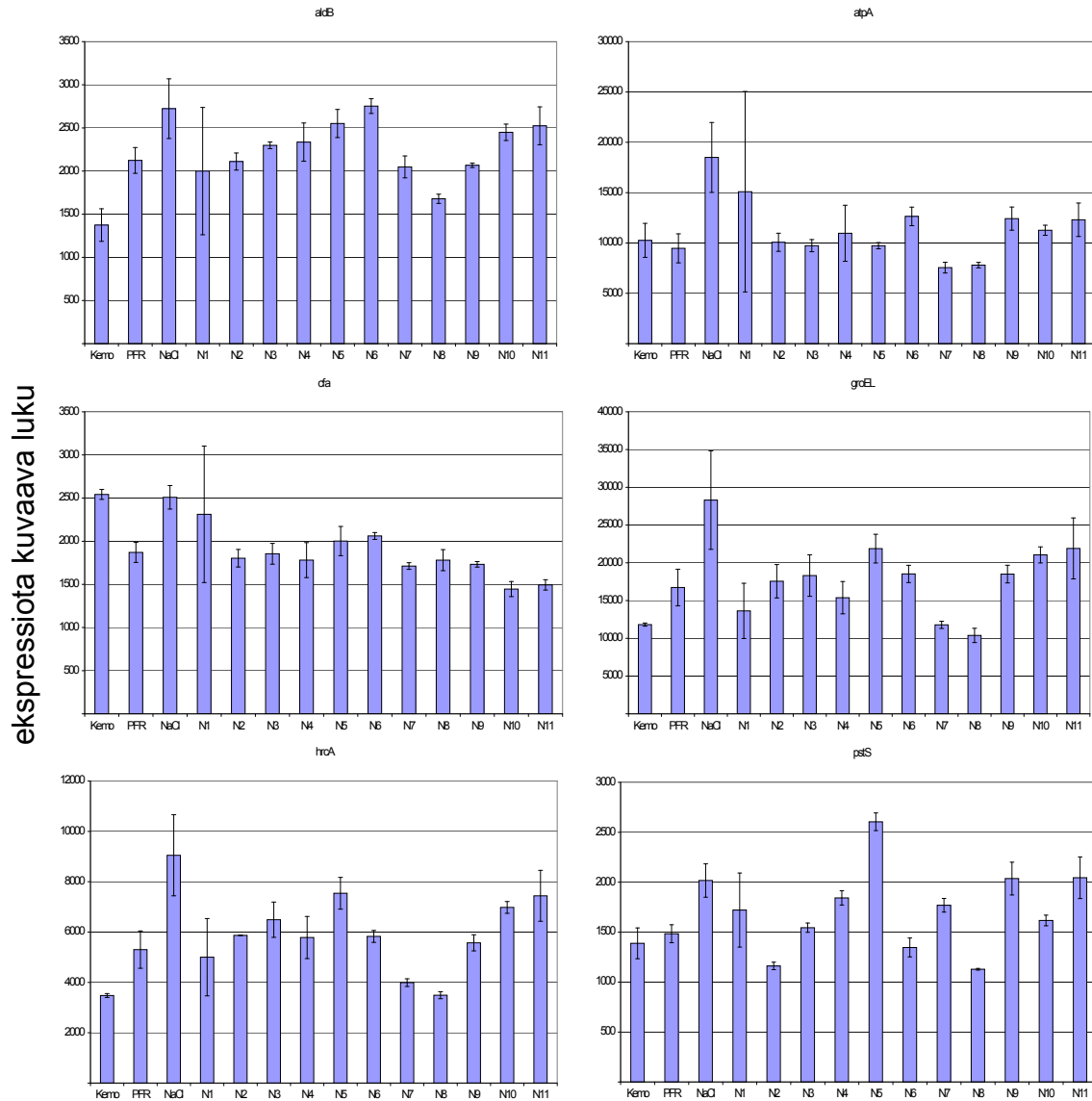
**Taulukko 11.** Scale-down-kokeiden toteutuneet lämpötila- ja pH-muutokset (Uuksulainen, 2010).

Koe	Suunnitellut arvot				Toteutuneet arvot			
	pH <sub>PFR</sub>	$\Delta$ pH	$\ln(T)^{-1}$	T(°C)	pH <sub>bioreaktori</sub>	pH <sub>PFR</sub>	$\Delta$ pH	T(°C)
1	6,20	0,57	0,283	34,4	5,30	5,74	0,44	34,4
2	5,63	0,00	0,283	34,4	5,30	5,30	0,00	34,4
3	6,20	0,57	0,277	37,0	5,30	5,76	0,46	37,0
4	6,20	0,57	0,283	34,4	5,25	5,77	0,52	34,4
5	6,60	0,97	0,279	36,2	5,32	6,20	0,88	36,2
6	5,80	0,17	0,279	36,2	5,40	5,47	0,07	36,0
7	6,20	0,57	0,289	32,0	5,24	5,47	0,23	32,0
8	5,80	0,17	0,287	32,7	5,42	5,38	-0,04	32,7
9	6,60	0,97	0,287	32,7	5,38	6,06	0,68	32,7
10	6,20	0,57	0,283	34,4	5,44	5,66	0,22	34,4
11	6,80	1,17	0,283	34,4	5,41	6,12	0,71	34,3

Kuvassa 22 on esitetty TRAC:illa saadut geeniekspressiotulokset scale-down-kasvatuksesta otetuista näytteistä. Lähes kaikkien geenien ekspressio on ollut korkeimmillaan NaCl-kokeessa. Tämä viittaisi siihen, että suolalla on ollut stressaava vaikutus, mikä näkyy geeniekspressiossa. Mielenkiintoisesti ekspressiot ovat kuitenkin pääsääntöisesti alhaisempia koesuunnitelman varsinaisissa kokeissa, vaikka niissä on käytetty samaa suolakonsentraatiota kuin NaCl-kokeessa.

Eri kokeiden välillä kasvatussystemin on annettu tasapainottua kemostaattikokeissa käytetyn tavan mukaisesti, joten ennen koesuunnitelmaa tehdyn NaCl-kokeen ei pitäisi vaikuttaa koesuunnitelman kokeisiin (Uuksulainen, 2010). Bakteereilla on kuitenkin havaittu epigeneettistä säätelyä, mitä ei voida huomioida tämän tyyppisessä koejärjestelyssä. Epigeneettinen säätely bakteereilla on esitetty katsauksessa

(Casadesús ja Low, 2006). Kokeessa käytetyn suolakonsentraation (yli 0,2 M) suuruusluokkaa olevan konsentraation on havaittu aiheuttavan osmoottista stressiä *Lb. plantarum* -bakteerilla (Pieterse *et al.*, 2005). Suolan ja muun stressin kuten lämpötilan tai pH:n muutoksen aiheuttamalla stressillä voi olla ristikkäisvaikutuksia, mikä voi osaltaan vaikuttaa tuloksiin.



**Kuva 22.** Scale-down-kasvatuksesta otettujen näytteiden geeniekspressiotulokset TRAC:illa mitattuina. Ekspressiot on normalisoitu vertailugeenin (*ldhD*) suhteen. Kuvassa "Kemo" tarkoittaa kemostaatista otettua näytettä tilanteesta, jolloin tulppavirtausreaktoria ei oltu vielä kytketty. "PFR" on näyte tilanteesta, jossa tulppavirtausreaktori on kytketty. "NaCl" viittaa NaCl-kokeeseen ja loput ovat numeroaan vastaavia koesuunnitelman kokeiden näytteitä.

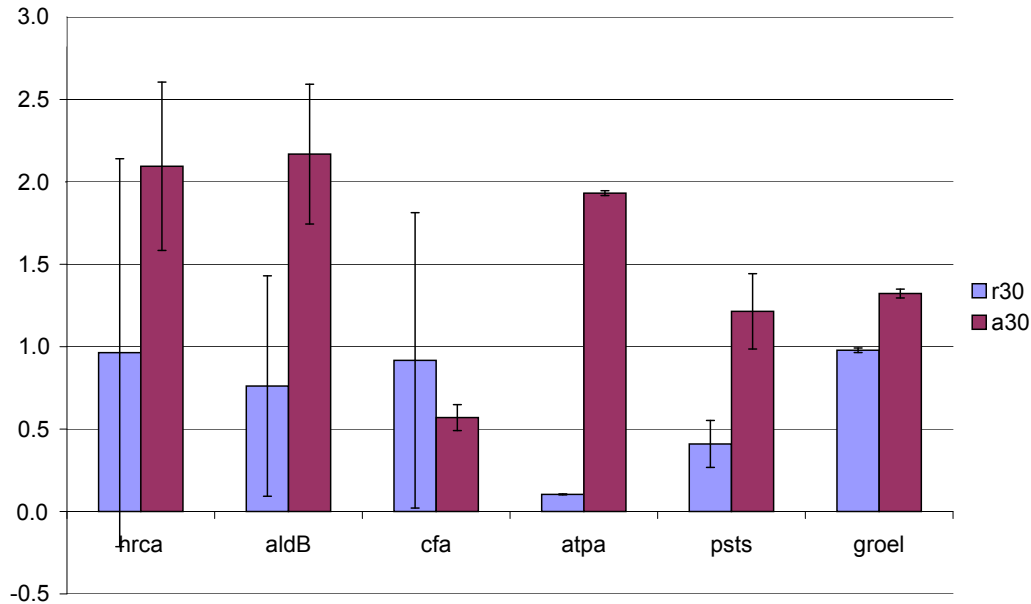
Geenien ekspressiot vaihtelevat ”PFR”- ja ”Kemo”-kokeiden (kts. kuvan 22 kuvateksti) välillä lukuun ottamatta geenejä *atpA* ja *pstS*. Tämä viittaisi siihen, että näiden kahden esikokeen välillä vaihtelevilla geeneillä esiintyy jonkin verran biologista vaihtelua tai että näiden kahden esikokeen koeasettelun välillä on merkitystä kasvatukselle. Bioreaktoriin lisätty tulppavirtausreaktori vaikuttaa käytännössä olosuhteisiin sekoituksen heikennyksenä.

Silmämääräisellä tarkastelulla kuvassa 22 esitetyistä ekspressioista on huomattavaa, että geenien *hrcA* ja *groEL* ekspressiot kokeiden välillä näyttävät korreloivan hyvin. Näiden välinen Pearson-korrelaatio onkin 0,97. Näiden geenien ekspressoitumisten välillä tulisikin olla yhteys, sillä *hrcA* toimii *groEL*-geenin säätelijänä (kts. kirjallisuusosa, alaluku 7.2). Nämä geenit ekspressoituvat toistensa kanssa samankaltaisesti myös panoskasvatuksissa (kuvat 19 ja 21). *hrcA*- ja *groEL*-geenien ekspressioiden välinen suhde näyttäisi pysyvän vakiona näiden välisessä säätelyssä. Myös geeni *aldB* ekspressoituu samankaltaisesti kuin *groEL*. Geenien *aldB* ja *groEL* välinen korrelaatio on 0,81. Yksityiskohtaisempi analyysi geenien ekspressioiden muutoksista koesuunnitelman kokeissa on käsitelty tämän luvun alaluvussa 12.6.

## 12.5 Happostressikokeen geeniekspressiot

Scale-down-kasvatuksessa tehdyissä kokeissa kasvuolosuhteiden pH:ta muutettiin vain kasvattamalla sitä. Näiden kokeiden näytteille tehdyillä happostressikokeilla voitiin tutkia myös happostressin vaikutusta geeniekspressioon. Tällä ei kuitenkaan ollut pääpaino tutkimuksessa ja geeniekspressioanalyysit rajoitettiin yhteen otokseen, jossa happostressattu näyte oli lähtöisin koesuunnitelman kokeesta 10 (taulukko 11). Geeniekspressioanalyysit tehtiin vain qPCR:llä. Tulokset on esitetty kuvassa 23. Vertailupisteenä kuvassa 23 on käytetty näytteitä ennen happostressikokeen käsittelyjä. Muutokset ovat vertailupisteeseen verrattuja suhdelukuja. Kuvan 23 a30 viittaa happostressattuihin näytteisiin ja r30 näytteisiin, jotka kävivät läpi saman käsittelyn ilman happoa.

TRAC:in ja qPCR:n välillä tehtyjen vertailujen ja qPCR:ssä esiintyneen suuren hajonnan perusteella tulokset eivät ole kovin luotettavia. TRAC- ja qPCR-vertailujen perusteella kuitenkin näytti siltä, että ekspressiomuutosten ollessa suuria qPCR:n tulokset olivat saman suuntaisia TRAC:in kanssa. Tämä huomioon ottaen näyttäisi siltä, että *atpA*-geenin ekspressoituminen olisi voimakkaasti yhteydessä happostressiin. Ekspressio on lähes 20-kertainen happokäsiteltyjen ja käsittelemättömien näytteiden välillä. *atpA*-geenin transkriptiotuote vastaa protoneja kuljettavan  $F_1F_0$ -ATPaasin yhdestä osasta ja *atpA*:n ekspression on havaittu aiemmin kasvavan happostressissä (kts. kirjallisuusosa, alaluku 7.3). Toisaalta *atpA*:n ekspression muutos vertailunäytteeseen nähden on huomattavan pieni, mikä osaltaan kyseenalaistaa tulosten luotettavuutta.



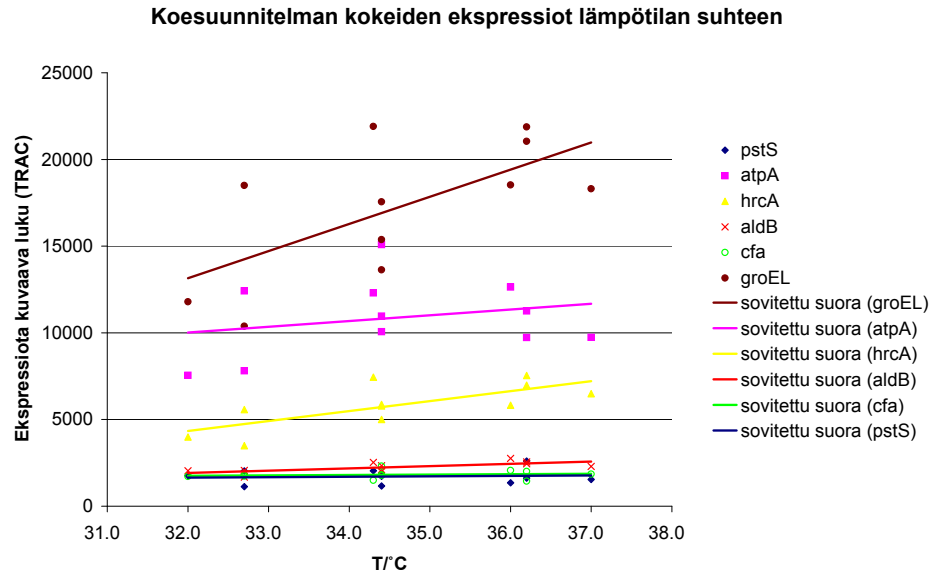
**Kuva 23.** Hapostressikokeesta saadut geeniekspressiotulokset qPCR:llä. Vertailugeeninä on *ldhD* ja vertailupisteenä näytteet ennen hapostressikäsitelyä. a30 viittaa 30 minuuttia hapostressattuihin näytteisiin ja r30 vastaavan käsittelyn saaneisiin näytteisiin hapostressiä lukuun ottamatta.

## 12.6 Scale-down-kokeiden geeniekspressioiden data-analyysi

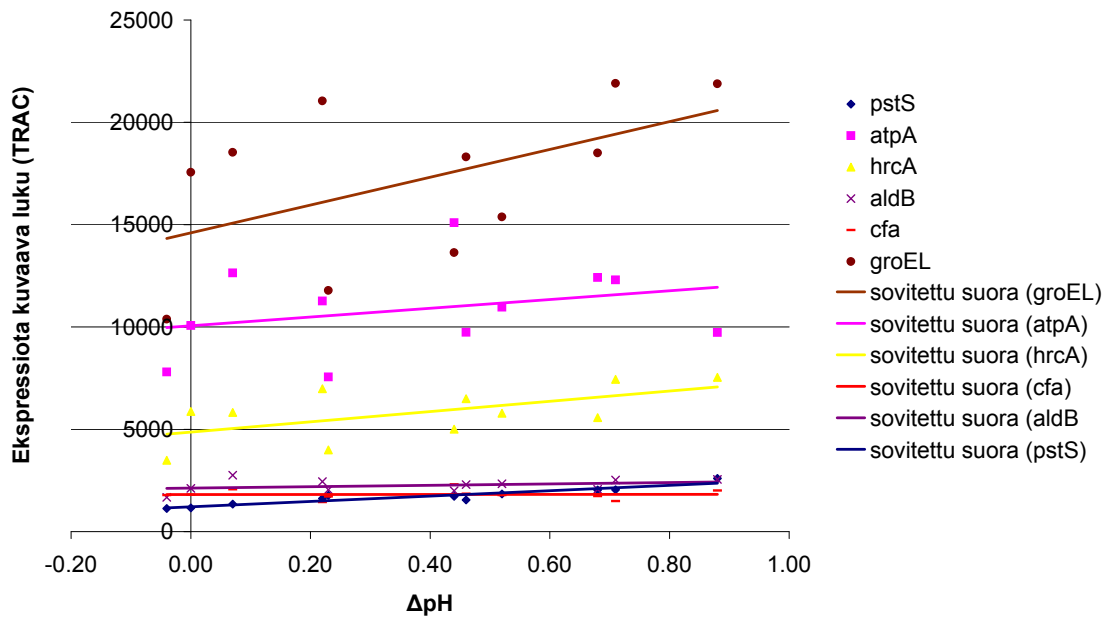
Scale-down-kasvatuksessa toteutetuille koesuunnitelman kokeille ja niistä otetuille geeniekspressionäytteille tehtiin data-analyysi tutkittujen geenien mahdollisten lämpötila- ja pH-vasteiden selvittämiseksi. Lisäksi työn tarkoituksena oli selvittää tutkittujen geenien ekspressioiden mahdollisia yhteyksiä pakkaskestävyyteen ja haponsietokykyyn, mitä myös selvitetään tässä alaluvussa. Esitettyjen mallien luontiin on käytetty kokeissa toteutuneita lämpötila- ja pH-arvoja (taulukko 11). pH:sta on käytetty muutosta ( $\Delta pH$ ) bioreaktorin ja tulppavirtausreaktorin välillä. Tämä muutos on ylöspäin pH-asteikolla. Lämpötilasta malleissa on käytetty linearisoitua muotoa  $\ln(T)^{-1}$  kuten Uuksulaisen (2010) työssä paitsi suoran sovituksissa (kuva 24). Mallien vasteina on käytetty TRAC:illa saatuja geeniekspressiotuloksia, jotka on normalisoitu vertailugeenin (*ldhD*) suhteen.

Kuvissa 24 ja 25 on esitetty geenien ekspressoitumiset lämpötilan ja pH:n muutoksen suhteen. Eniten lämpötilan suhteen ovat muuttuneet geenien *groEL* ja *hrcA* ekspressiot (kuva 24). Samat geenit ovat muuttuneet eniten myös pH:n muutoksen suhteen (kuva 25).

Taulukossa 12 on esitetty kuvissa 24 ja 25 näkyvien suorien sovituksen  $R^2$ -arvot. Näiden perusteella näyttäisi siltä, että geenit *groEL* ja *hrcA* antaisivat vasteen sekä lämpötilan, että pH:n muutokseen kuten edellä mainittiin. Lisäksi *pstS*-geenin eksp-



**Kuva 24.** Geenien ekspressoitumiset koesuunnitelman kokeissa lämpötilan suhteen.

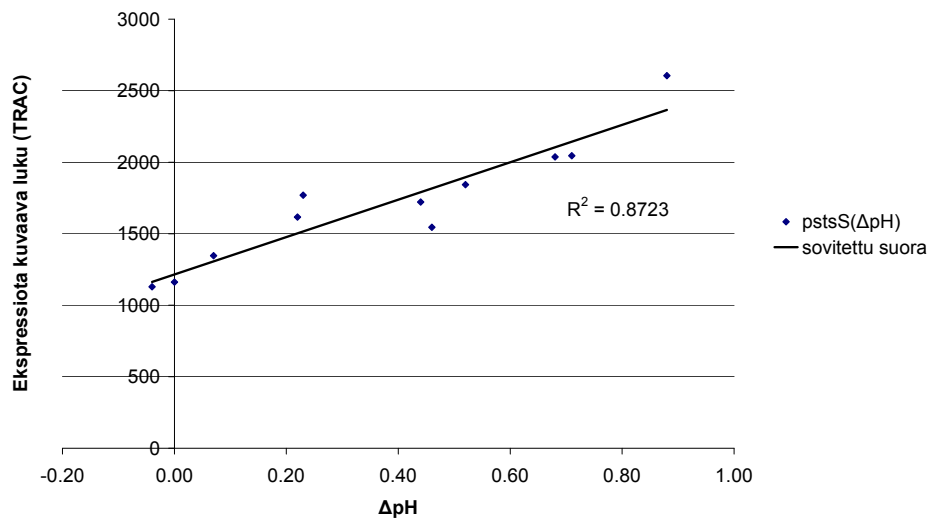


**Kuva 25.** Geenien ekspressoitumiset koesuunnitelman kokeissa pH:n muutoksen suhteen.

ressio näyttäisi sovittuvan huomattavan hyvin suoralle pH:n muutoksen suhteen, kun vastaavasti lämpötilaa vasten sovitettun suoran  $R^2$ -arvo on pieni tälle geenille. Kuvassa 26 on esitetty *pstS*-geenin ekspressoituminen pH:n muutoksen suhteen. Ottaen huomioon, että suurin toteutunut pH:n muutos on alle yhden pH-yksikön, ja *pstS*-geenin ekspressio yli kaksinkertaistuu (normalisoituna *ldhD*:n suhteen) tällä välillä, *pstS*-geeni näyttäisi antavan hyvin vasteita pH-muutokseen asteikoissa emäksiseen suuntaan lämpötilasta riippumatta.

**Taulukko 12.**  $R^2$ -arvot geeniekspressioille sovitetuille suorille lämpötilan ja pH-muutoksen suhteen.

	<i>groEL</i>	<i>atpA</i>	<i>hrcA</i>	<i>aldB</i>	<i>cfa</i>	<i>pstS</i>
T	0,33	0,06	0,45	0,45	0,12	0,02
$\Delta pH$	0,28	0,088	0,35	0,12	0,00	0,87



**Kuva 26.** *pstS*-geenin ekspressoituminen pH:n muutoksen suhteen.

Molempien muuttujien (lämpötila ja pH) vaikutusten huomioimiseksi eri geenien ekspression selittämiseksi generoitiin erilaisia lineaarisia regressiomalleja (taulukko 9). Malleissa on käytetty lämpötilasta muotoa  $\ln(T)^{-1}$ , jossa  $T$  on kelvineinä, ja pH:n muutosta bioreaktorin pH:sta. Mallit ja niiden hyvyttä kuvaavat  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvot määritettiin liitteen E koodilla. Taulukossa 13 on esitetty generoitujen mallien  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvot.

Generoitujen mallien  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvojen (taulukko 13) perusteella näyttäisi siltä, että paras malli selittävyydeltään ja ennustavuudestaan *pstS*-geenin ekspressiolle on muotoa  $\beta_0 + \beta_1 dpH$  ( $R^2 = 0,87$  ja  $Q^2 = 0,80$ ) eli suora pH:n muutoksen suhteen, mikä on esitetty kuvassa 26. Parhaimpia  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvoja kokeillailla mallirakenteilla saatiin geeneille *hrcA* rakenteella  $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \varepsilon$  ( $R^2 = 0,74$  ja  $Q^2 = 0,55$ ) ja geenille *groEL* vastaavalla rakenteella ( $R^2 = 0,57$  ja  $Q^2 = 0,23$ ) sekä geenille *atpA* rakenteella  $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 dpH \cdot T + \varepsilon$  ( $R^2 = 0,76$  ja  $Q^2 = 0,27$ ).

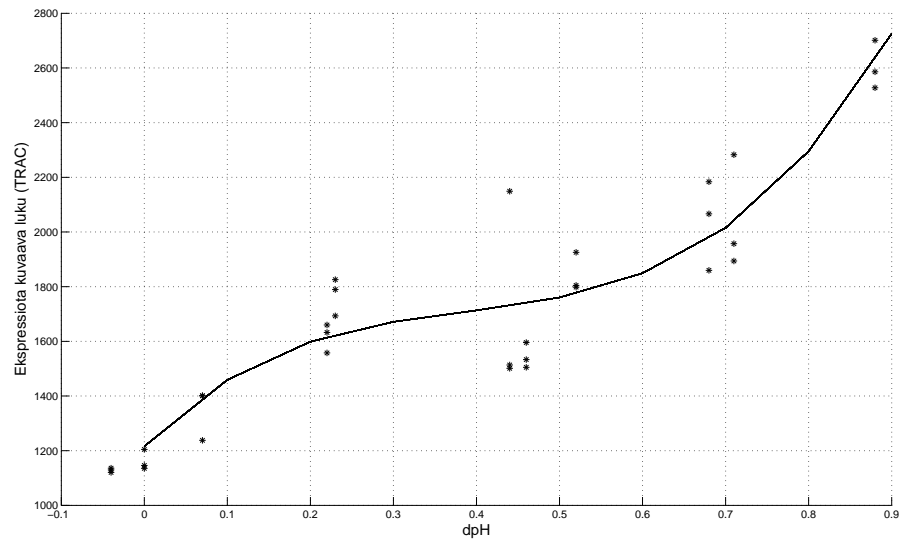
**Taulukko 13.** Eri mallirakenteilla eri geeneille saadut  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvot.

$R^2$ -arvot						
Mallirakenne	<i>pstS</i>	<i>atpA</i>	<i>hrcA</i>	<i>aldB</i>	<i>cfa</i>	<i>groEL</i>
$\beta_0 + \beta_1 dpH$	0,8723	0,0880	0,3516	0,1161	0,0001	0,2803
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2$	0,8851	0,1980	0,3624	0,1162	0,0020	0,3119
$\beta_0 + \beta_3 T$	0,0164	0,0580	0,4466	0,4507	0,1180	0,3341
$\beta_0 + \beta_3 T + \beta_4 T^2$	0,0174	0,3989	0,5410	0,4828	0,1215	0,4047
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T$	0,8820	0,1185	0,6453	0,4850	0,1234	0,4962
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T$	0,8960	0,2350	0,6511	0,4853	0,1240	0,5199
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \beta_4 T^2$	0,8829	0,4601	0,7403	0,5172	0,1269	0,5672
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \beta_5 dpH$	0,8992	0,5901	0,6672	0,5789	0,1250	0,5677
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 dpH \cdot T$	0,9034	0,7579	0,7550	0,6029	0,1278	0,6846
$Q^2$ -arvot						
Mallirakenne	<i>pstS</i>	<i>atpA</i>	<i>hrcA</i>	<i>aldB</i>	<i>cfa</i>	<i>groEL</i>
$\beta_0 + \beta_1 dpH$	0,8000	-0,3559	0,0360	-0,3959	-0,4026	-0,0490
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2$	0,6906	-0,4293	-0,2224	-0,8480	-1,0067	-0,3101
$\beta_0 + \beta_3 T$	-0,5400	-0,5036	0,1851	0,1148	-0,1131	0,0130
$\beta_0 + \beta_3 T + \beta_4 T^2$	-0,9296	0,0436	0,2769	-0,3178	-0,4815	0,0417
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T$	0,7127	-0,7563	0,4297	-0,0519	-0,2524	0,1782
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T$	0,4691	-1,3149	0,2106	-0,3900	-0,7113	-0,1821
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \beta_4 T^2$	0,4700	-0,1974	0,5504	-0,4702	-0,6482	0,2297
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_3 T + \beta_5 dpH \cdot T$	0,5313	0,2713	0,3554	-0,3557	-0,5023	0,1486
$\beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 dpH \cdot T$	-0,3091	0,2691	0,2594	-2,4969	-2,2067	0,1351

Näille geenien ja mallirakenteiden yhdistelmille tehtiin huolellisempi mallin muodostus ja mallin tunnuslukujen sekä mallin termien merkitsevyyksien tarkastelu Modde-ohjelmalla (Modde 8.0.0.0, Umetrics AB). Tarkastelun perusteella parhaaksi malliksi saatiin *pstS*-geenin ekspressiolle  $1216,01 + 3066,28 \cdot dpH - 6970,03 \cdot dpH^2 + 6029,38 \cdot dpH^3$  ( $R^2 = 0,883$  ja  $Q^2 = 0,858$ )(kuva 27). Geenille *hrcA* parhaaksi malliksi saatiin  $-673068224 + 4025,12671 \cdot dpH + 771686451 \cdot T - 2256,22949 \cdot dpH^2 - 22118666240 \cdot T^2$  ( $R^2 = 0,883$  ja  $Q^2 = 0,83$ )(kuva 28) ja geenille *groEL*  $-911934592 - 4884583,5 \cdot dpH + 10471363584 \cdot T + 9395,3584 \cdot dpH^2 - 30058883072 \cdot T^2 + 27974266 \cdot dpH \cdot T$  ( $R^2 = 0,799$  ja  $Q^2 = 0,673$ )(kuva 29). Geeneille *hrcA* ja *groEL* saadut mallirakenteet poikkeavat hieman toisistaan. Näiden geenien ekspressiodatan välillä on kuitenkin suuri korrelaatio ja *hrcA*-geeniä pidetään *groEL*-geenin säätelijänä, joten samanlaiset mallirakenteet voisivat kuvata paremmin taustalla olevaa ilmiötä. Geenille *atpA* parhaaksi malliksi saatiin  $3045742,25 - 6698168,5 \cdot dpH - 17387210 \cdot T + 9410,79004 \cdot dpH^2 + 38336912 \cdot dpH \cdot T$  ( $R^2 = 0,825$  ja  $Q^2 = 0,758$ )(kuva 30). Mallien tunnusluvut on esitetty liitteessä F ja mallien luonnissa huomioimatta jätetyt poikkeavat pisteet on esitetty liitteessä D.

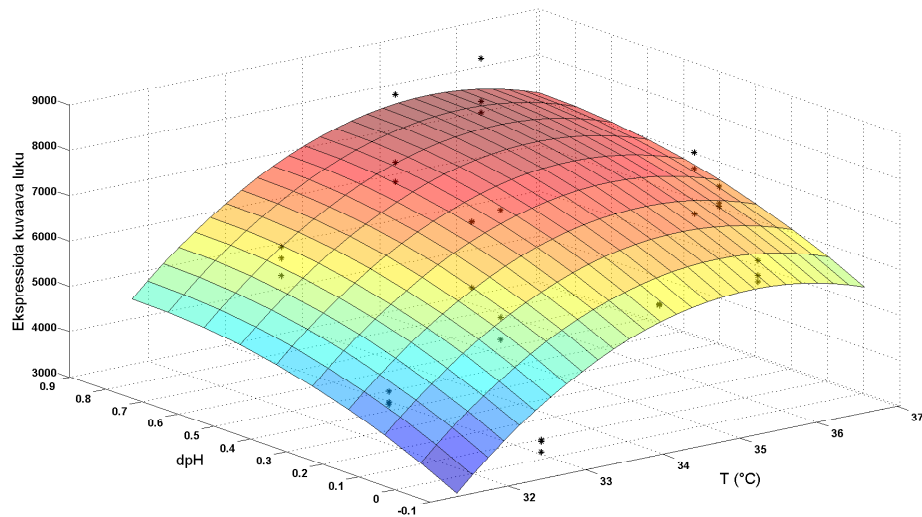
Muille geeneille (*aldB* ja *cfa*) kokeilla mallirakenteilla ei saatu kovin hyviä sovituksia. Tämä oli odotettavissa jo kuvien 24 ja 25 perusteella ekspressiomuutosten ollessa pieniä näillä geeneillä molempien muuttujien suhteen.

Kuvissa 28 ja 29 on esitetty *hrcA*- ja *groEL*-geeneille edellä mainittujen mallirakenteiden mukaiset vastepinnat. Jos mallirakenne geenille *groEL* vastaa todellista ilmiötä, geenin ekspressio kasvaa pH:n kasvaessa pH:sta 5,6 tai lämpötilan kasvaessa 32 °C:sta. *groEL*-geenin ekspressio näyttäisi kasvavan myös lämpötilan ja pH:n kasvaessa samanaikaisesti. *hrcA*-geenin ekspressio näyttäisi käyttäytyvän samankaltaisesti pH-muutoksen ja lämpötilan suhteen kuin *groEL*-geenin. *hrcA*-geeniä pidetään



**Kuva 27.** *pstS*-geenin ekspressoituminen esitettynä mallilla  $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 dpH \cdot T + \varepsilon$ . Pisteet kuvassa ovat todelliset vasteet.

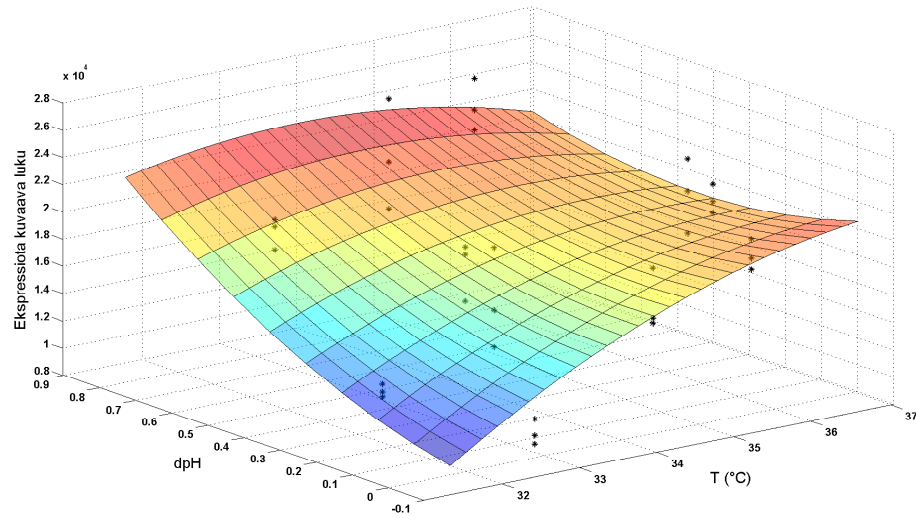
*groEL*-geenin säätelijänä, joten yhteys näiden geenien ekspression välillä oli odotettavissa.



**Kuva 28.** *hrcA*-geenin ekspressoituminen esitettynä mallilla  $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \varepsilon$ . Pisteet kuvassa ovat todelliset vasteet.

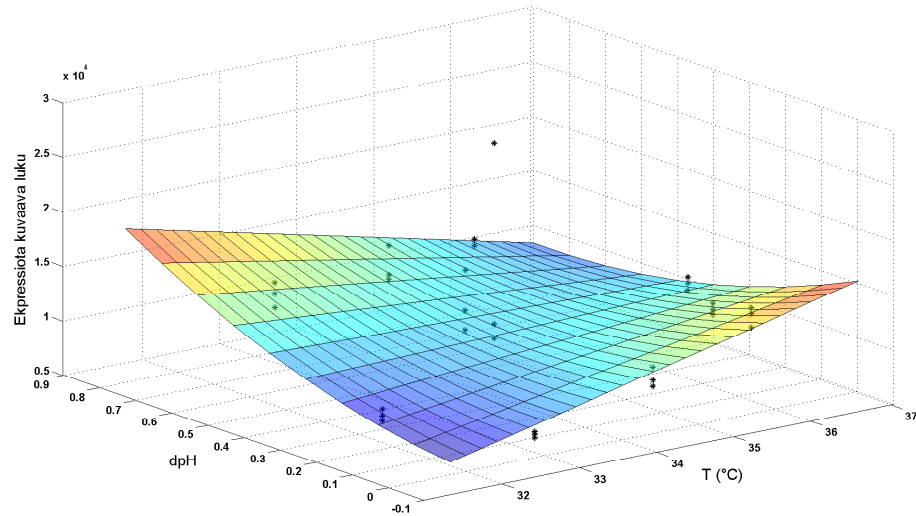
Kuvassa 30 on esitetty geenille *atpA* edellä mainitun mallirakenteen mukainen vas-





**Kuva 29.** *groEL*-geenin ekspressoituminen esitettynä mallilla  $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_4 T^2 + \beta_5 dpH \cdot T + \varepsilon$ . Pisteet kuvassa ovat todelliset vasteet.

tepinta. Jos mallirakenne geenille *atpA* vastaa todellista ilmiötä, geenin ekspresio kasvaa pH:n kasvaessa pH:sta 5,6 tai lämpötilan kasvaessa 32 °C:sta. Lämpötilan ja pH:n kasvaessa samanaikaisesti ekspresio ei näyttäisi kuitenkaan kasvavan kuten yhden muuttujan tapauksessa.



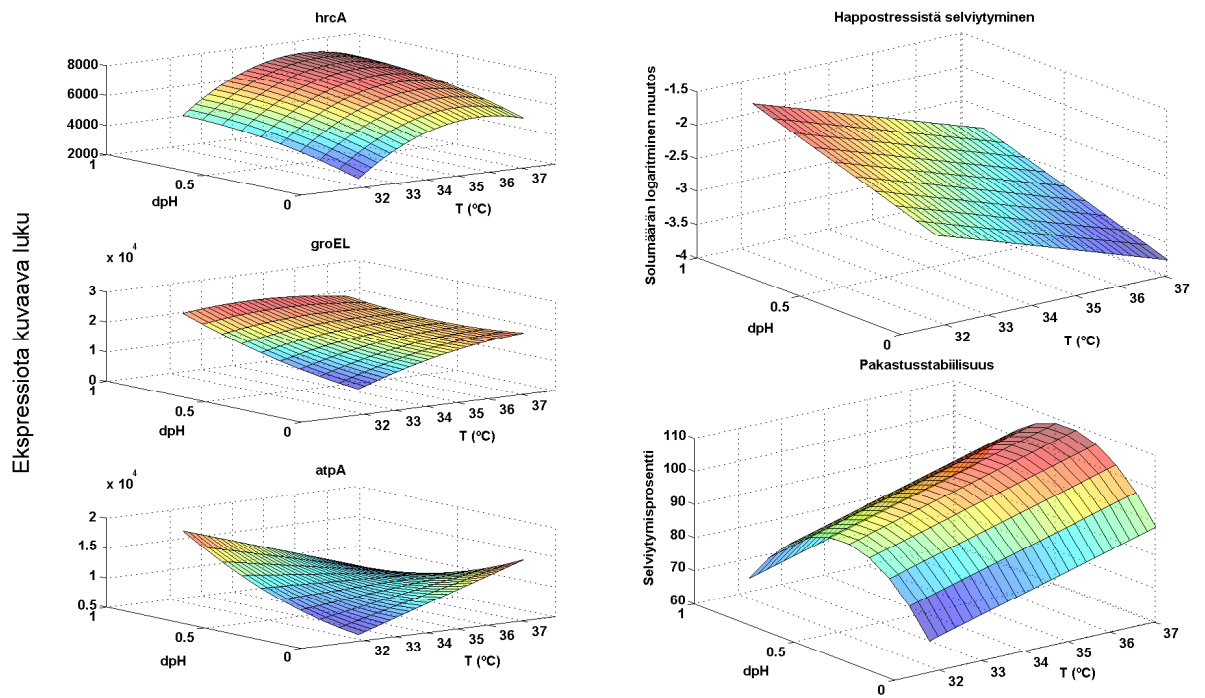
**Kuva 30.** *atpA*-geenin ekspressoituminen esitettynä mallilla  $y = \beta_0 + \beta_1 dpH + \beta_2 dpH^2 + \beta_3 T + \beta_5 dpH \cdot T + \varepsilon$ . Pisteet kuvassa ovat todelliset vasteet.

Työn yhtenä tavoitteena oli selvittää löytyykö tutkittujen geenien ekspressoitumisten ja pakkaskestävyyden tai haponsietokyvyn välistä yhteyttä. Tätä varten Uuksulaisen (2010) työstä omaksuttiin siinä esiteltyt vastepintamallit pakkaskestävyydelle ja haponsietokyvylle. Kuvassa 31 on esitetty geenien *hrcA*, *groEL* ja *atpA* ekspressoitumismallit verrattuna haponsietokyvyn malliin ja pakkaskestävyyssmalliin. Haponsietokyvyn mallin vaste on solupitoisuuden logaritmin muutos alkuperäisestä solupitoisuudesta ja pakkaskestävyyssmallin vaste on solujen prosentuaalinen selviytyminen pakastuksesta (Uuksulainen, 2010).

**Taulukko 14.** Tutkittujen geenien korrelaatiot haponsietokyvyn ja pakkaskestävyyden suhteen.

	<i>groEL</i>	<i>cfa</i>	<i>aldB</i>	<i>hrcA</i>	<i>atpA</i>	<i>pstS</i>
Haponsietokyky	0,41	0,68	0,44	0,40	0,45	-0,32
Pakkaskestävyys	0,41	-0,10	0,54	0,54	0,37	0,16

Kuvan 31 perusteella näyttäisi siltä, että geenien *hrcA*, *groEL* ja *atpA* ekspressoitumiset eivät yksiselitteisesti vastaa pakkaskestävyyttä eikä haponsietokykyä. *pstS*-geeni ekspressoitui vain pH:n muutoksen suhteen, joten senkään ekspressoituminen ei riitä selittämään pakkaskestävyyttä tai haponsietokykyä. Taulukossa 14 on esitetty tutkittujen geenien ekspressioiden korrelaatiot pakkaskestävyyden ja haponsietokyvyn suhteen. Korrelaatioiden määrittämisessä käytettiin samojen kokeiden tuloksia kuin pakkaskestävyyssmallin ja haponsietokyvyn mallin muodostamisessa (Uuksulainen, 2010). Paras korrelaatio on *cfa*-geenillä haponsietokyvyn suhteen. Tämän geenin ekspression suhteellinen muutos oli kuitenkin vähäistä tutkitulla lämpötilan ja pH:n muutosalueella.



**Kuva 31.** Geenien *hrcA*, *groEL* ja *atpA* ekspressoitumisvastepinnat (vasemmalla puolella olevat pinnat) verrattuna haponsietokyvyn vastepintaan ja pakastuskestävyyden vastepintaan (oikealla puolella olevat pinnat).

## 13 Yhteenveto

Tässä työssä tutkittiin pH-muutosten vaikutusta teollisuudessa käytetyn maitohappobakteerikannan *Lb. rhamnosus* GG:n geeniekspressioon. Kasvatusjärjestelyinä käytettiin panoskasvatuksia teollisella ravintoalustalla ja laboratoriravintoalustalla sekä teollisella ravintoalustalla tehtyä scale-down-kasvatusta, jonka yhteydessä tehtiin erilaisia stressikokeita. Panoskasvatuksissa reaktorin pH:n annettiin muuttua oskilloinnin omaisesti. Scale-down-kasvatuksella tutkittiin myös lämpötilan vaikutusta. Lämpötilan ja pH:n lisäksi tutkittiin myös geenien ekspressoitumisen yhteyttä bakteerin pakkaskestävyyteen ja haponsietokykyyn.

Geeniekspression tutkimiseen käytettiin kahta menetelmää, TRAC:ia ja qPCR:ää. Tarkoituksena oli vertailla näitä menetelmiä qPCR:n ollessa vakiintuneempi menetelmä. qPCR:n tuloksissa oli huomattavaa hajontaa, joten menetelmiä ei voinut vertailla luotettavasti. Tulokset olivat kuitenkin molemmilla menetelmillä karkeasti samansuuntaiset. Tutkittaviksi valitut 6 geeniä ja vertailugeeni valittiin kirjallisuuden perusteella. Vertailugeeninä oli *ldhD* ja tutkittavina geneinä *groEL*, *atpA*, *hrcA*, *aldB*, *cfa* ja *pstS*.

Panoskasvatuksista ilmeni, että geenien ekspressoitumisessa näyttäisi olevan eroa kasvatuksissa käytettyjen alustojen välillä. Tutkittujen geenien ekspressiot muutuivat suhteessa pääsääntöisesti vähemmän teollisella ravintoalustalla kuin laboratorioravintoalustalla kasvun eri vaiheissa, mutta ekspressoitumismäärät olivat suurempia teollisella ravintoalustalla. Laboratorioravintoalustalla tutkittujen geenien ekspressio pääsääntöisesti kasvoi stationäärivaiheessa verrattuna edeltävään eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen.

Scale-down-kasvatuksessa tehtiin kokeita, joissa tulppavirtausreaktorin pH vaihteli välillä 5,3–6,2 ja lämpötila välillä 32,0–37,0 °C. Merkittävimmin tutkituista geeneistä antoi vasteita *groEL*, *hrcA*, *atpA* ja *pstS*. *pstS*-geenin ekspressio kasvoi pH:n kasvun suhteen tutkitulla välillä riippumatta lämpötilan muutoksesta, siten että ekspressio yli kaksinkertaistui tutkitulla pH-muutosvälillä. *pstS*-geenin translaatio tuote toimii fosfaattispesifin ABC-transportterin substraattina sitoutuvana osana. On esitetty, että *pst*-systemin indusoituminen emäksisessä ympäristössä perustuu solun huonoon fosfaatin saantiin (Hornbæk *et al.*, 2004). Geenien *groEL* ja *hrcA* ekspressiot kasvoivat sekä pH:n että lämpötilan kasvaessa. *groEL*-geeniä pidetään yleisenä stressigeeninä ja *hrcA*-geeniä sen negatiivisena säätelijänä (Zuber ja Schumann, 1994). Näiden geenien ekspressioiden muutokset korreloivat keskenään voimakkaasti (myös panoskasvatuksissa). *atpA*-geeni, jonka translaatiotuote toimii osana vetytransportteria, ekspressoitui pH:n tai lämpötilan kasvaessa. *atpA*-geenin ekspression on havaittu kasvavan myös muilla organismeilla pH:n kasvaessa (Wilks *et al.*, 2009; Stolyar *et al.*, 2007). Tämän on selitetty kompensoivan korkeassa solun ulkoisessa pH:ssa vähentyntä protonikäyttövoimaa ATP-syntaasin kasvun myötä (Maurer *et al.*, 2005). Tutkittujen geenien ekspressoitumisen ja haponsietokyvyn tai pakkaskestävyyden välillä ei ilmennyt selvää yhteyttä.

## 14 Jatkotutkimusehdotuksia

Työn tuloksista ilmeni yksi selvä käytännön menetelmiin liittyvä jatkoselvityksen tarve. Työssä käytetyn qPCR:n vaatimat esikäsittelyt tulisi optimoida virheen minimoimiseksi. Varsinkin, jos laitetta on tarkoitus käyttää vastaavanlaisissa tutkimuksissa kuin tässä työssä.

Tässä työssä ongelmaa lähestyttiin etsimällä kirjallisuudesta ilmiöön liittyviä geenejä, joista pienelle osajoukolle pyrittiin löytämään vasteita pH:n muutokseen, pakaskkestävyyteen ja haponsietokykyyn. Toisenlainen lähestyminen voisi kuitenkin olla palkitsevampi. Ilmiöön liittyviä geenejä voisi kartoittaa laajemmin käyttämällä DNA-siruja, joilla voi tutkia useampien geenien tai koko genomin ekspressiota. Toisaalta kaikkia tämän työn kirjallisuusosiossa mainittuja stressiin liittyviä geenejä ja proteiineja, kuten DnaK, DnaJ, GrpE ja ClpB, ei saatu mahdutettua kokeellisen osan tutkimukseen. Näiden geenien ekspressioiden yhteyttä stressin sietoon olisi mahdollista tutkia TRAC:illa tai qPCR:lläkin.

Yksi ehkä lähinnä tieteellistä mielenkiintoa herättävä tutkimuksen kohde on *pstS*-geenin ekspression muutos, joka vaikutti lähes lineaariselta, pH-muutoksen suhteen jatkuvassa kasvatuksessa. Tämä työ kattoi kuitenkin vain pienen pH-välin. Voisi olla mielenkiintoista selvittää miten ekspressio käyttäytyy laajemmalla pH-välillä, esim. koko kasvun sallimalla pH-alueella.

Probioottisten tuotteiden tuotannossa käytetty ravintoalusta on usein koostumukseltaan erilainen kuin niiden tutkimiseen käytetty ravintoalusta. Tässä työssä tehtyjen panoskasvatusten tulokset viittaisivat kuitenkin ravintoalustariippuvaisiin eroihin geeniekspressiotasolla, minkä vuoksi erilaisten kasvatusalustojen välisten erojen tutkiminen voisi olla mielekästä.

## Viitteet

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., JA WALTER, P., (2002a). 6. *How Cells Read the Genome: From DNA to Protein*, s. 299–305. Molecular Biology of the Cell. Garland Science, 270 Madison Avenue, New York, Yhdysvallat, 4. painos.
- AMACHI, S., ISHIKAWA, K., TOYODA, S., KAGAWA, Y., YOKOTA, A., JA TOMITA, F., (1998). Characterization of a Mutant of *Lactococcus lactis* with Reduced Membrane-bound ATPase Activity under Acidic Conditions. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 62, nro. 8, 1574–1580.
- ANONYM., (2008). PCR Virtual Lab. <http://learn.genetics.utah.edu/content/labs/pcr/>. Viitattu 31.07.2009.
- ARIKADO, E., ISHIHARA, H., EHARA, T., SHIBATA, C., SAITO, H., KAKEGAWA, T., IGARASHI, K., JA KOBAYASHI, H., (1999). Enzyme level of enterococcal  $F_1F_0$ -ATPase is regulated by pH at the step of assembly. *European Journal of Biochemistry* 259, nro. 1-2, 262–268.
- ATALLA, A. JA SCHUMANN, W., (2003). The *pst* Operon of *Bacillus subtilis* is Specifically Induced by Alkali Stress. *Journal of Bacteriology* 185, nro. 16, 5019–5022.
- AXE, D. D. JA BAILEY, J. E., (1995). Transport of Lactate and Acetate Through the Energized Cytoplasmic Membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering* 47, nro. 1, 8–19.
- AXELSSON, L., (2004). Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *Food Science and Technology (New York, NY, Yhdysvallat)* 139, nro. Lactic Acid Bacteria, 1–66.
- BABST, M., HENNECKE, H., JA FISCHER, H.-M., (1996). Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Microbiology* 19, nro. 4, 827–839.
- BAKER, W., VAN DEN BROEK, A., CAMON, E., HINGAMP, P., STERK, P., STOESSER, G., JA TULI, M. A., (2000). The EMBL Nucleotide Sequence Database. *Nucleic Acids Research* 28, nro. 1, 19–23.
- BERGER, B., REZZONICO, E., JA ARIGONI, F., (2009). Stress tolerant bifidobacteria. PCT Int. Appl., EP2008/008898, 30.04.2009.
- BOND, D. JA RUSSELL, J., (1996). A Role for Fructose 1,6-Diphosphate in the ATPase-Mediated Energy-Spilling Reaction of *Streptococcus bovis*. *Applied and Environmental Microbiology* 62, nro. 6, 2095–2099.
- BORE, E., LANGSRUD, S., LANGSRUD, O., RODE, T. M., JA HOLCK, A., (2007). Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology (Reading, United Kingdom)* 153, nro. 7, 2289–2303.

- BROADBENT, J. R. JA LIN, C., (1999). Effect of Heat Shock or Cold Shock Treatment on the Resistance of *Lactococcus lactis* to Freezing and Lyophilization. *Cryobiology* 39, nro. 1, 88–102.
- BUDIN-VERNEUIL, A., MAGUIN, E., AUFFRAY, Y., EHRLICH, S. D., JA PICHEREAU, V., (2005a). Transcriptional analysis of the cyclopropane fatty acid synthase gene of *Lactococcus lactis* MG1363 at low pH. *FEMS Microbiology Letters* 250, nro. 2, 189–194.
- BUDIN-VERNEUIL, A., PICHEREAU, V., AUFFRAY, Y., EHRLICH, D. S., JA MAGUIN, E., (2005b). Proteomic characterization of the acid tolerance response in *Lactococcus lactis* MG1363. *Proteomics* 5, nro. 18, 4794–4807.
- BURGESS, C., O'CONNELL-MOTHERWAY, M., SYBESMA, W., HUGENHOLTZ, J., JA VAN SINDEREN, D., (2004). Riboflavin Production in *Lactococcus lactis*: Potential for In Situ Production of Vitamin-Enriched Foods. *Applied and Environmental Microbiology* 70, nro. 10, 5769–5777.
- CASADESÚS, J. JA LOW, D., (2006). Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70, nro. 3, 830–856.
- CERNING, J., (1990). Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 87, nro. 1-2, 113–130.
- CHANG, Y.-Y. JA CRONAN, J. E., (1999). Membrane cyclopropane fatty acid content is a major factor in acid resistance of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 33, nro. 2, 249–259.
- CORCORAN, B. M., STANTON, C., FITZGERALD, G., JA ROSS, R. P., (2008a). Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design* 14, nro. 14, 1382–1399.
- CORCORAN, B. M., STANTON, C., FITZGERALD, G., JA ROSS, R. P., (2008b). Life under stress: the probiotic stress response and how it may be manipulated. *Current Pharmaceutical Design* 14, nro. 14, 1382–1399.
- COTTER, P. D. JA HILL, C., (2003). Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low pH. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67, nro. 3, 429–453.
- CRONAN, J. E., (2002). Phospholipid modifications in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 5, nro. 2, 202–205.
- DAVIDSON, A. L., DASSA, E., ORELLE, C., JA CHEN, J., (2008). Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, nro. 2, 317–364.



- DESMOND, C., STANTON, C., FITZGERALD, G. F., COLLINS, K., JA ROSS, R. P., (2002). Environmental adaptation of probiotic *Lactobacilli* towards improvement of performance during spray drying. *International Dairy Journal* 12, nro. 2-3, 183–190.
- DESROCHE, N., BELTRAMO, C., JA GUZZO, J., (2005). Determination of an internal control to apply reverse transcription quantitative PCR to study stress response in the lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Journal of Microbiological Methods* 60, nro. 3, 325–333.
- DRICI-CACHON, Z., GUZZO, J., CAVIN, J. F., JA DIVIÉS, C., (1996). Acid tolerance in *Leuconostoc oenos*. Isolation and characterization of an acid-resistant mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology* 44, nro. 6, 785–789.
- ERIKSSON, L., JOHANSSON, E., KETTANEH-WOLD, N., WIKSTRÖM, C., JA WOLD, S., (2000). *Statistical Appendix*, s. 293–319. Design of Experiments: Principles and Applications. Umetrics Academy, Umeå, Ruotsi, 1. painos.
- FILLINGAME, R. H. JA DIVALL, S., (1999). Proton ATPases in bacteria: comparison to *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> as the prototype. In: Chadwick, D. J. ja Cardew, G. (toim.), *Symp. 221*, s. 218, Novartis Foundation. Novartis Foundation.
- FIOCOCCO, D., CRISSETTI, E., CAPOZZI, V., JA SPANO, G., (2008). Validation of an internal control gene to apply reverse transcription quantitative PCR to study heat, cold and ethanol stresses in *Lactobacillus plantarum*. *World Journal of Microbiology Biotechnology* 24, nro. 6, 899–902.
- FISCHER, R.-J., OEHMCKE, S., MEYER, U., MIX, M., SCHWARZ, K., FIEDLER, T., JA BAHL, H., (2006). Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on phosphate concentration and pH. *Journal of Bacteriology* 188, nro. 15, 5469–5478.
- FOSTER, J. W. JA HALL, H. K., (1990). Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *The Journal of Bacteriology* 172, nro. 2, 771–778.
- FOZO, E. M., KAJFASZ, J. K., JA QUIVEY, R. G., (2004). Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiology Letters* 238, nro. 2, 291–295.
- FUTAI, M., NOUMI, T., JA MAEDA, M., (1989). ATP Synthase ( $H^+$ -ATPase): Results by Combined Biochemical and Molecular Biological Approaches. *Annual Review of Biochemistry* 58, nro. 1, 111–136.
- GASCH, A. P., SPELLMAN, P. T., KAO, C. M., CARMEL-HAREL, O., EISEN, M. B., STORZ, G., BOTSTEIN, D., JA BROWN, P. O., (2000). Genomic Expression Programs in the Response of Yeast Cells to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell* 11, nro. 12, 4241–4257.



- GIOTIS, E. S., MUTHAIYAN, A., BLAIR, I. S., WILKINSON, B. J., JA MCDOWELL, D. A., (2008). Genomic and proteomic analysis of the Alkali-Tolerance Response (AlTR) in *Listeria monocytogenes* 10403S. *BMC Microbiology* 8, nro. 102.
- GROGAN, D. W. JA CRONAN, J. E. J., (1997). Cyclopropane Ring Formation in Membrane Lipids of Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 61, nro. 4, 429–441.
- GUANDALINI, S., PENSABENE, L., ZIKRI, M. A., DIAS, J. A., CASALI, L. G., HOEKSTRA, H., KOLACEK, S., MASSAR, K., MICETIC-TURK, D., PAPADOPOULOU, A., DE SOUSA, J. S., SANDHU, B., SZAJEWSKA, H., JA WEIZMAN, Z., (2000). Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 30, nro. 1, 54–60.
- GUILLOT, A., OBIS, D., JA MISTOU, M.-Y., (2000). Fatty acid membrane composition and activation of glycine-betaine transport in *Lactococcus lactis* subjected to osmotic stress. *International Journal of Food Microbiology* 55, nro. 1-3, 47–51.
- GUPTA, P., ANDREW, H., KIRSCHNER, B. S., JA GUANDALINI, S., (2000). Is Lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 31, nro. 4, 453–457.
- HARTKE, A., BOUCHE, S., GIARD, J.-C., BENACHOUR, A., BOUTIBONNES, P., JA AUFRAY, Y., (1996). The Lactic Acid Stress Response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology* 33, nro. 3, 194–199.
- HELANTO, M., (2009). *Metabolic Engineering of Lactic Acid Bacteria for Production of Mannitol, L-ribulose and L-ribose*. Väitöskirja, Teknillinen korkeakoulu, Kemian ja materiaalitieteiden tiedekunta, Biotekniikan ja kemian tekniikan laitos.
- HICKEY, M. W., HILLIER, A. J., JA JAGO, G. R., (1983). Metabolism of pyruvate and citrate in *lactobacilli*. *Australian Journal of Biological Sciences* 36, nro. 5-6, 487–496.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., JA WATSON, R., (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Bio/Technology* 11, nro. 9, 1026–1030.
- HOAGLIN, D. C. JA WELSCH, R. E., (1978). The Hat Matrix in Regression and ANOVA. *The American Statistician* 32, nro. 1, 17–22.
- HORNBÆK, T., JAKOBSEN, M., DYNESSEN, J., JA NIELSEN, A. K., (2004). Global transcription profiles and intracellular pH regulation measured in *Bacillus licheniformis* upon external pH upshifts. *Archives of Microbiology* 182, nro. 6, 467–474.

- HUGENHOLTZ, J., SYBESMA, W., GROOT, M. N., WISSELINK, W., LADERO, V., BURGESS, K., VAN SINDEREN, D., PIARD, J.-C., EGGINK, G., SMID, E., SAVOY, G., SESMA, F., JANSEN, T., HOLS, P., JA KLEEREBEZEM, M., (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, nro. 1, 217–235.
- HUTKINS, R. W. JA NANNEN, N. L., (1993). pH Homeostasis in Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science* 76, nro. 8, 2354–2365.
- JAN, G., LEVERRIER, P., PICHÉREAU, V., JA BOYAVAL, P., (2001). Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Applied and Environmental Microbiology* 67, nro. 5, 2029–2036.
- JOHNSSON, T., NIKKILÄ, P., TOIVONEN, L., ROSENQVIST, H., JA LAAKSO, S., (1995). Cellular Fatty Acid Profiles of *Lactobacillus* and *Lactococcus* Strains in Relation to the Oleic Acid Content of the Cultivation Medium. *Applied and Environmental Microbiology* 61, nro. 12, 4497–4499.
- KAILA, M., ISOLAURI, E., SOPPI, E., VIRTANEN, E., LAINE, S., JA ARVILOMMI, H., (1992). Enhancement of the Circulating Antibody Secreting Cell Response in Human Diarrhea by a Human *Lactobacillus* Strain. *Pediatric Research* 32, nro. 2, 141–144.
- KALLIOMÄKI, M., SALMINEN, S., ARVILOMMI, H., KERO, P., KOSKINEN, P., JA ISOLAURI, E., (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357, nro. 9262, 1076–1079.
- KANDLER, O., (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 49, nro. 3, 209–224.
- KANEHISA, M., ARAKI, M., GOTO, S., HATTORI, M., HIRAKAWA, M., ITOH, M., KATAYAMA, T., KAWASHIMA, S., OKUDA, S., TOKIMATSU, T., JA YAMANISHI, Y., (2008). KEGG for linking genomes to life and the environment. *Nucleic Acids Research* 36, nro. suppl<sub>1</sub>, D480 – 484.
- KOSKENNIEMI, K., KOPONEN, J., KANKAINEN, M., SAVIJOKI, K., TYNKKYNNEN, S., DE VOS, W. M., KALKKINEN, N., JA VARMANEN, P., (2009). Proteome analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG using 2-D DIGE and mass spectrometry shows differential protein production in laboratory and industrial-type growth media. *Journal of Proteome Research* 8, nro. 11, 4993–5007.
- KULLEN, M. J. JA KLAENHAMMER, T. R., (1999). Identification of the pH-inducible, proton-translocating  $F_1F_0$ -ATPase (*atpBEFHAGDC*) operon of *Lactobacillus acidophilus* by differential display: gene structure, cloning and characterization. *Molecular Microbiology* 33, nro. 6, 1152–1161.
- KWON, S., YOO, I.-K., LEE, W. G., CHANG, H. N., JA CHANG, Y. K., (2001). High-Rate Continuous Production of Lactic Acid by *Lactobacillus rhamnosus* in a

- Two-Stage Membrane Cell-Recycle Bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 73, nro. 1, 25–34.
- LEAPHART, A. B., THOMPSON, D. K., HUANG, K., ALM, E., WAN, X.-F., ARKIN, A., BROWN, S. D., WU, L., YAN, T., LIU, X., WICKHAM, G. S., JA ZHOU, J., (2006). Transcriptome Profiling of *Shewanella oneidensis* Gene Expression following Exposure to Acidic and Alkaline pH. *Journal of Bacteriology* 188, nro. 4, 1633–1642.
- LEE, K., LEE, H.-G., PI, K., JA CHOI, Y.-J., (2008). The effect of low pH on protein expression by the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri*. *Proteomics* 8, nro. 8, 1624–1630.
- LIVAK, K. J. JA SCHMITTGEN, T. D., (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, nro. 4, 402–408.
- LORCA, G. L. JA DE VALDEZ, G. F., (2001). A Low-pH-Inducible, Stationary-Phase Acid Tolerance Response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology* 42, nro. 1, 21–25.
- LORCA, G. L., RAYA, R. R., TARANTO, M. P., JA VALDEZ, G. F. D., (1998). Adaptive acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus*. *Biotechnology Letters* 20, nro. 3, 239–241.
- LORCA, G. L., VALDEZ, G. F. D., JA LJUNGH, A., (2002). Characterization of the Protein-Synthesis Dependent Adaptive Acid Tolerance Response in *Lactobacillus acidophilus*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 4, nro. 6, 525–532.
- MAGEE, R. J. JA KOSARIC, N., (1987). The microbial production of 2,3-butanediol. *Advances in Applied Microbiology* 32, 89–161.
- MAJAMAA, H. JA ISOLAURI, E., (1997). Probiotics: A novel approach in the management of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 99, nro. 2, 179–185.
- MARTEAU, P., MINEKUS, M., HAVENAAR, R., JA J. H. J. HUIS IN'T VELD, (1997). Survival of Lactic Acid Bacteria in a Dynamic Model of the Stomach and Small Intestine: Validation and the Effects of Bile. *Journal of Dairy Science* 80, nro. 6, 1031–1037.
- MAURER, L. M., YOHANNES, E., BONDURANT, S. S., RADMACHER, M., JA SLONCZEWSKI, J. L., (2005). pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12. *The Journal of Bacteriology* 187, nro. 1, 304–319.
- MOGK, A., HOMUTH, G., SCHOLZ, C., KIM, L., SCHMID, F. X., JA SCHUMANN, W., (1997). The GroE chaperonin machine is a major modulator of the CIRCE heat shock regulon of *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal* 16, nro. 15, 4579–4590.

- NANNEN, N. L. JA HUTKINS, R. W., (1991). Proton-Translocating Adenosine Triphosphatase Activity in Lactic Acid Bacterial. *Journal of Dairy Science* 74, nro. 3, 747–751.
- NOLAN, T., HANDS, R. E., JA BUSTIN, S. A., (2006). Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1, nro. 3, 1559–1582.
- PIETERSE, B., JELLEMA, R. H., JA VAN DER WERF, M. J., (2006). Quenching of microbial samples for increased reliability of microarray data. *Journal of Microbiological Methods* 64, nro. 2, 207–216.
- PIETERSE, B., LEER, R. J., SCHUREN, F. H. J., JA VAN DER WERF, M. J., (2005). Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology* 151, nro. 12, 3881–3894.
- PIOCH, D., JUERGEN, B., EVERS, S., MAURER, K. H., HECKER, M., JA SCHWEDER, T., (2007). At-line Monitoring of Bioprocess-Relevant Marker Genes. *Engineering in Life Sciences* 7, nro. 4, 373–379.
- PRASAD, J., MCJARROW, P., JA GOPAL, P., (2003). Heat and Osmotic Stress Responses of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) in Relation to Viability after Drying. *Applied and Environmental Microbiology* 69, nro. 2, 917–925.
- RALLU, F., GRUSS, A., JA MAGUIN, E., (1996). *Lactococcus lactis* and stress. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, nro. 2-4, 243–251.
- RAUTIO, J. JA SUOMALAINEN, S., (2009). High-content gene expression analysis with TRAC using Thermo Scientific KingFisher Flex sample processing. Thermo Fisher Scientific, Application Note.
- RAUTIO, J. J., BAILEY, M., KIVIOJA, T., SÖDERLUND, H., PENTTILÄ, M., JA SALOHEIMO, M., (2007a). Physiological evaluation of the filamentous fungus *Trichoderma reesei* in production processes by marker gene expression analysis. *BMC Biotechnology* 7, nro. 28.
- RAUTIO, J. J., HUUSKONEN, A., VUOKKO, H., VIDGREN, V., JA LONDESBOROUGH, J., (2007b). Monitoring yeast physiology during very high gravity wort fermentations by frequent analysis of gene expression. *Yeast* 24, nro. 9, 741–760.
- RAUTIO, J. J., KATAJA, K., SATOKARI, R., PENTTILÄ, M., SÖDERLUND, H., JA SALOHEIMO, M., (2006a). Rapid and multiplexed transcript analysis of microbial cultures using capillary electrophoresis-detectable oligonucleotide probe pools. *Journal of Microbiological Methods* 65, nro. 3, 404–416.
- RAUTIO, J. J., SATOKARI, R., VEHEMAAN-KREULA, P., SERKKOLA, E., JA SÖDERLUND, H., (2008). TRAC in high-content gene expression analysis: applications in microbial population studies, process biotechnology and biomedical research. *Expert Review of Molecular Diagnostics* 8, nro. 4, 379–385.

- RAUTIO, J. J., SMIT, B. A., WIEBE, M., PENTTILÄ, M., JA SALOHEIMO, M., (2006b). Transcriptional monitoring of steady state and effects of anaerobic phases in chemostat cultures of the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *BMC Genomics* 7.
- ROZEN, S. JA SKALETSKY, H., (2000). Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Methods in Molecular Biology (Totowa, New Jersey)* 132, nro. Bioinformatics Methods and Protocols, 365–386.
- SAARELA, M. H., ALAKOMI, H. L., PUHAKKA, A., JA MATTO, J., (2009). Effect of the fermentation pH on the storage stability of *Lactobacillus rhamnosus* preparations and suitability of *in vitro* analyses of cell physiological functions to predict it. *Journal of Applied Microbiology* 106, nro. 4, 1204–1212.
- SALKINOJA-SALONEN, M. (toim.), (2002). 5. *Mikrobien geneettiset ominaisuudet*, s. 331–339. Mikrobiologian perusteita. Gummerus Kirjapaino Oy, Jyväskylä, 1. painos.
- SALMINEN, S. JA VON WRIGHT, A., (1998). *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspect*. Marcel Dekker, Inc., New York, 2. painos.
- SATOKARI, R. M., KATAJA, K., JA SÖDERLUND, H., (2005). Multiplexed Quantification of Bacterial 16S rRNA by Solution Hybridization with Oligonucleotide Probes and Affinity Capture. *Microbial Ecology* 50, nro. 1, 120–127.
- SAWATARI, Y. JA YOKOTA, A., (2007). Diversity and Mechanisms of Alkali Tolerance in Lactobacilli. *Applied and Environmental Microbiology* 73, nro. 12, 3909–3915.
- SERVANT, P. JA MAZODIER, P., (2001). Negative regulation of the heat shock response in Streptomyces. *Archives of Microbiology* 176, nro. 4, 237–242.
- SHABALA, L. JA ROSS, T., (2008). Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H<sup>+</sup> and enhanced ability to extrude H<sup>+</sup>. *Research in Microbiology* 159, nro. 6, 458–461.
- SÖDERLUND, H. JA RAUTIO, J. J., (2009). Method and Test Kit for Detecting Nucleotide Variations. Pat-hak. IPC8 luokka: AC40B2004FI.
- SÖDERLUND, H., SATOKARI, R., KATAJA, K., JA TAKKINEN, K., (2008). Method and Test Kit for Quantitative Determination of Polynucleotides in a Mixture. Pat-hak. IPC8 luokka: AC12Q168FI.
- SPECK, E. L. JA FREESE, E., (1973). Control of Metabolite Secretion in *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* 78, nro. Pt. 2, 261–275.
- STÅHLBERG, A., HÅKANSSON, J., XIAN, X., SEMB, H., JA KUBISTA, M., (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical Chemistry* 50, nro. 3, 509–515.

- STEPHANOPOULOS, G., ARISTIDOU, A. A., JA NIELSEN, J., (1998). 5. *Regulation of Metabolic Pathways*, s. 150–193. *Metabolic Engineering: Principles and Methodologies*. Academic Press, 525 B Street, Suite 1900, San Diego, California 92101-4495, USA, kuvitettu painos.
- STILES, M. E., (1996). Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 70, nro. 2, 331–345.
- STOLYAR, S., HE, Q., JOACHIMIAK, M. P., HE, Z., YANG, Z. K., BORGLIN, S. E., JOYNER, D. C., HUANG, K., ALM, E., HAZEN, T. C., ZHOU, J., WALL, J. D., ARKIN, A. P., JA STAHL, D. A., (2007). Response of *Desulfovibrio vulgaris* to Alkaline Stress. *The Journal of Bacteriology* 189, nro. 24, 8944–8952.
- SUGIMOTO, S., ABDULLAH-AL-MAHIN, JA SONOMOTO, K., (2008). Molecular Chaperones in Lactic Acid Bacteria: Physiological Consequences and Biochemical Properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 106, nro. 4, 324–336.
- SUOKKO, A., (2008). *The stress responses of probiotic Lactobacilli and a Bifidobacterium with special emphasis on Clp family proteins*. Väitöskirja, Helsingin yliopisto, Eläinlääketieteellinen tiedekunta, Peruseläinlääketieteen laitos.
- SUOKKO, A., POUTANEN, M., SAVIJOKI, K., KALKKINEN, N., JA VARMANEN, P., (2008). ClpL is essential for induction of thermotolerance and is potentially part of the HrcA regulon in *Lactobacillus gasserii*. *Proteomics* 8, nro. 5, 1029–1041.
- SUZUKI, T., UNEMOTO, T., JA KOBAYASHI, H., (1988). Novel Streptococcal Mutants Defective in the Regulation of H<sup>+</sup>-ATPase Biosynthesis and in F<sub>0</sub> Complex. *Journal of Biological Chemistry* 263, nro. 24, 11840–11843.
- TAYLOR, F. JA CRONAN, J. E. J., (1976). Selection and Properties of *Escherichia coli* Mutants Defective in the Synthesis of Cyclopropane Fatty Acids. *Journal of Bacteriology* 125, nro. 2, 518–523.
- TOURDOT-MARÉCHAL, R., FORTIER, L.-C., GUZZO, J., LEE, B., JA DIVIÉS, C., (1999). Acid sensitivity of neomycin-resistant mutants of *Oenococcus oeni*: a relationship between reduction of ATPase activity and lack of malolactic activity. *FEMS Microbiology Letters* 178, nro. 2, 319–326.
- TSAU, J. L., GUFFANTI, A. A., JA MONTVILLE, T. J., (1992). Conversion of pyruvate to acetoin helps to maintain pH homeostasis in *Lactobacillus plantarum*. *Applied and Environmental Microbiology* 58, nro. 3, 891–894.
- URBACH, G., (1995). Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products. *International Dairy Journal* 5, nro. 8, 877–903.
- UUKSULAINEN, T., (2010). *pH- ja lämpötilagradienttien vaikutus Lactobacillus rhamnosus GG:n kasvuun ja elävyyteen*. Diplomityö, Aalto-yliopiston teknillinen korkeakoulu, Kemian ja materiaalitieteiden tiedekunta, Biotekniikan ja kemian tekniikan laitos.



- VAN DE GUCHTE, M., PENAUD, S., GRIMALDI, C., BARBE, V., BRYSON, K., NICOLAS, P., ROBERT, C., OZTAS, S., MANGENOT, S., COULOUX, A., LOUX, V., DERVYN, R., BOSSY, R., BOLOTIN, A., BATTO, J. M., WALUNAS, T., GIBRAT, J. F., BESSIERES, P., WEISSENBAACH, J., EHRLICH, S. D., JA MAGUIN, E., (2006). The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, nro. 24, 9274–9279.
- VAN DE GUCHTE, M., SERROR, P., CHERVAUX, C., SMOKVINA, T., EHRLICH, S. D., JA MAGUIN, E., (2002). Stress responses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 82, nro. 1-4, 187–216.
- VEERKAMP, J. H., (1971). Fatty acid composition of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Journal of Bacteriology* 108, nro. 2, 861–867.
- VUYST, L. D. JA LEROY, F., (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *J Mol Microbiol Biotechnol* 13, 194–199.
- WALKER, D. C., GIRGIS, H. S., JA KLAENHAMMER, T. R., (1999). The *groESL* Chaperone Operon of *Lactobacillus johnsonii*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, nro. 7, 3033–3041.
- WANG, A. Y. JA CRONAN, J. E. J., (1994). The growth phase-dependent synthesis of cyclopropane fatty acids in *Escherichia coli* is the result of an RpoS(KatF)-dependent promoter plus enzyme instability. *Molecular Microbiology* 11, nro. 6, 1009–1017.
- WANG, Y., CORRIEU, G., JA BEAL, C., (2005). Fermentation pH and Temperature Influence the Cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Journal of Dairy Science* 88, nro. 1, 21–29.
- WEBB, D. C., ROSENBERG, H., JA COX, G. B., (1992). Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *Journal of Biological Chemistry* 267, nro. 34, 24661–24668.
- WELMAN, A. D. JA MADDOX, I. S., (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges.
- WIEBE, M. G., RINTALA, E., TAMMINEN, A., SIMOLIN, H., SALUSJARVI, L., TOIVARI, M., KOKKONEN, J. T., KIURU, J., KETOLA, R. A., JOUHTEN, P., HUUSKONEN, A., MAAHEIMO, H., RUOHONEN, L., JA PENTTILA, M., (2008). Central carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in anaerobic, oxygen-limited and fully aerobic steady-state conditions and following a shift to anaerobic conditions. *FEMS Yeast Research* 8, nro. 1, 140–154.
- WILHELM, J. JA PINGOUD, A., (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chem-BioChem* 4, nro. 11, 1120–1128.

- WILKS, J. C., KITKO, R. D., CLEETON, S. H., LEE, G. E., UGWU, C. S., JONES, B. D., BONDURANT, S. S., JA SLONCZEWSKI, J. L., (2009). Acid and base stress and transcriptomic responses in *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 75, nro. 4, 981–990.
- WISSELINK, H. W., WEUSTHUIS, R. A., EGGINK, G., HUGENHOLTZ, J., JA GROBBEN, G. J., (2002). Mannitol production by lactic acid bacteria: a review. *International Dairy Journal* 12, nro. 2-3, 151–161.
- WOOD, B. J. B. (toim.), (1998). *Fermented Milks*, s. 309–350. Microbiology of Fermented Foods. Blakie Academic Professional, Lontoo, 2. painos painos.
- YAMAMOTO, N., MASUJIMA, Y., JA TAKANO, T., (1996). Reduction of membrane-bound ATPase activity in a *Lactobacillus helveticus* strain with slower growth at low pH. *FEMS microbiology letters* 138, nro. 2-3, 179–184.
- ZHU, Y., ZHANG, Y., JA LI, Y., (2009). Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, nro. 4, 597–610.
- ZUBER, U. JA SCHUMANN, W., (1994). CIRCE, a Novel Heat Shock Element Involved in Regulation of Heat Shock Operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *The Journal of Bacteriology* 176, nro. 5, 1359–1363.

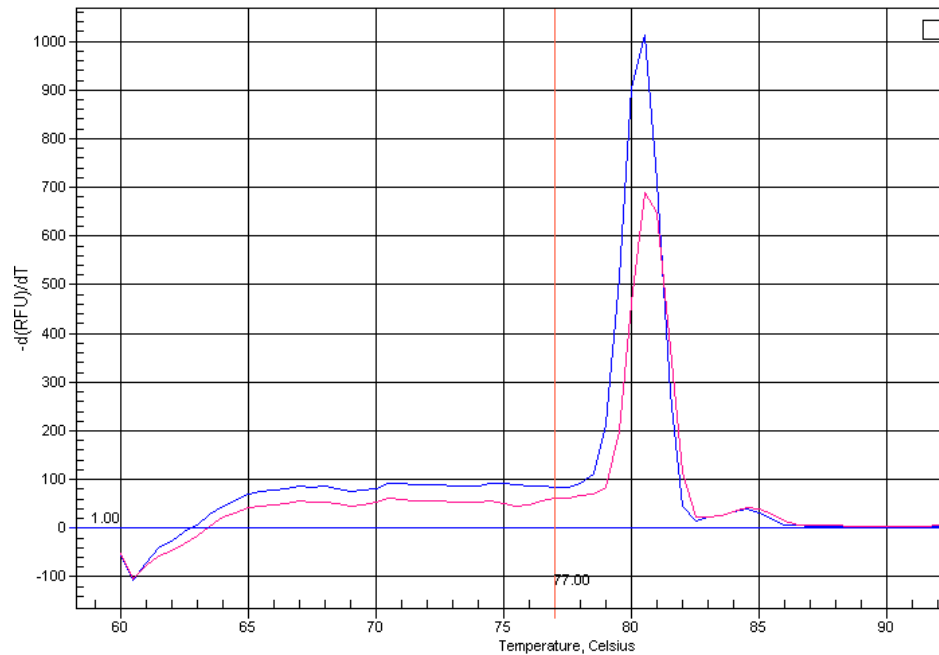


Osa III

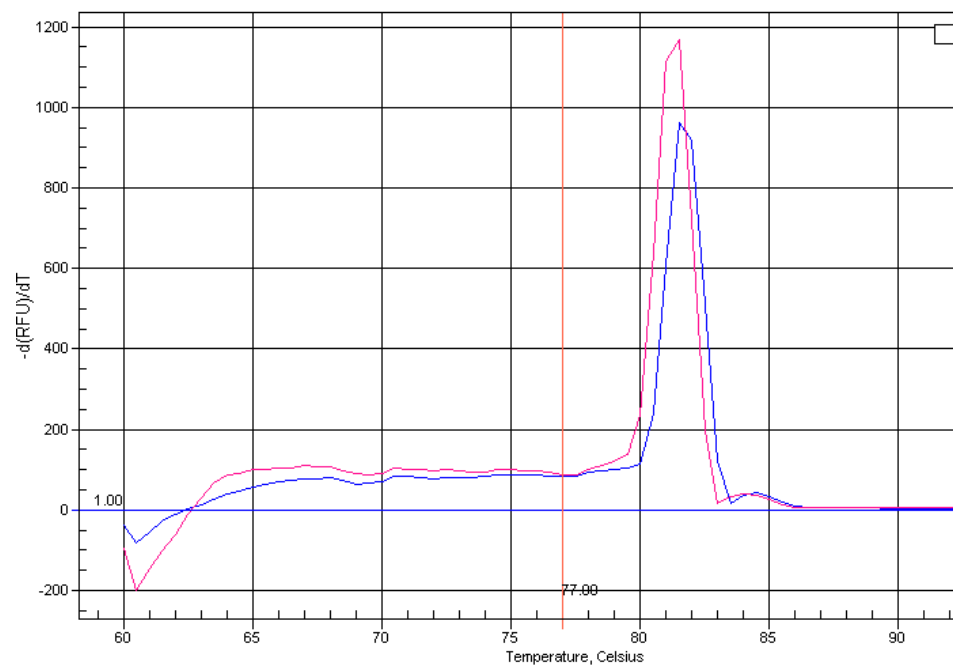
## Liitteet

## A Liite: qPCR:n alukkeiden sulamiskäyräanalyysit

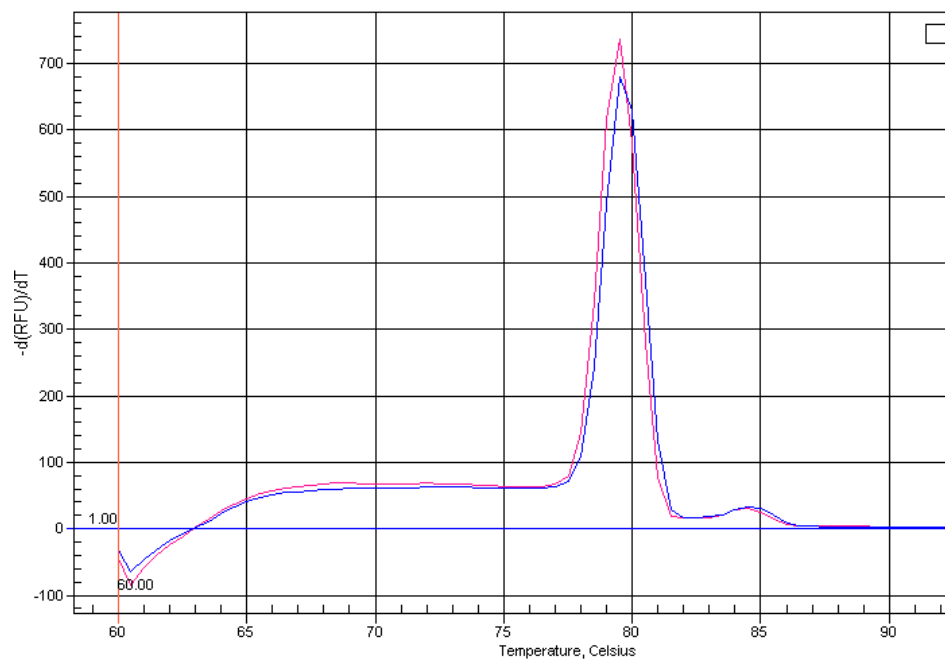
Kuvissa A1–A7 on esitetty tutkituille geeneille käytettyjen alukkeiden qPCR:n monistustuotteiden sulamiskäyrät. Kullekin alukeparille käytettiin kahta rinnakkaista qPCR-levyn kaivoa sulamiskäyräanalyysissä. Alukkeet näyttävät olevan spesifejä monistustuotteelleen.



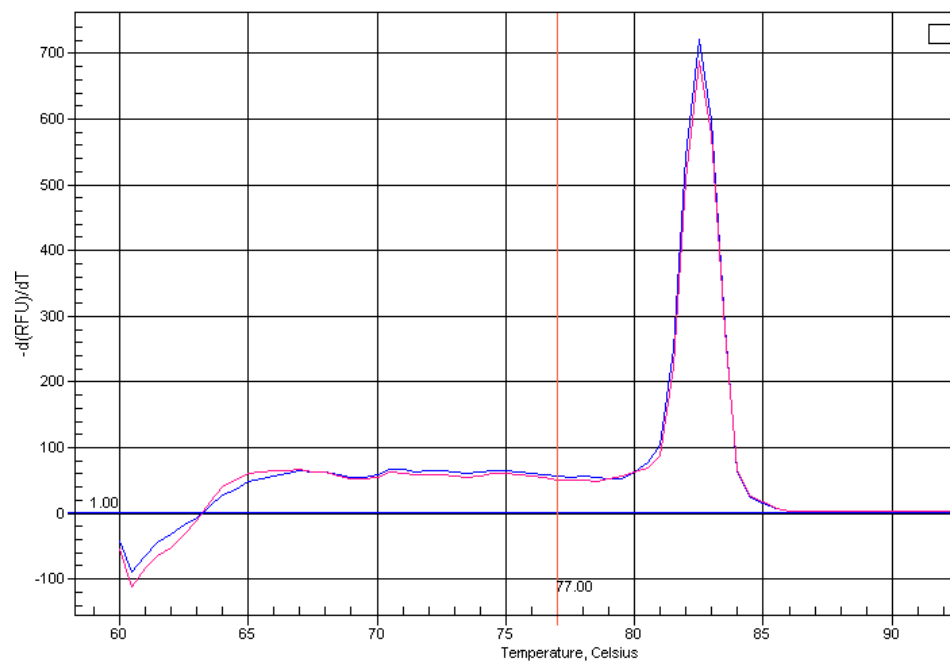
**Kuva A1.** Geenille *aldB* käytetyn alukeparin antaman monistustuotteen sulamiskäyrät. Sinisellä ja punaisella värillä on esitetty rinnakkaisten kaivojen sulamiskäyrät.  $-d(RFU)/dT$  on suhteellisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.



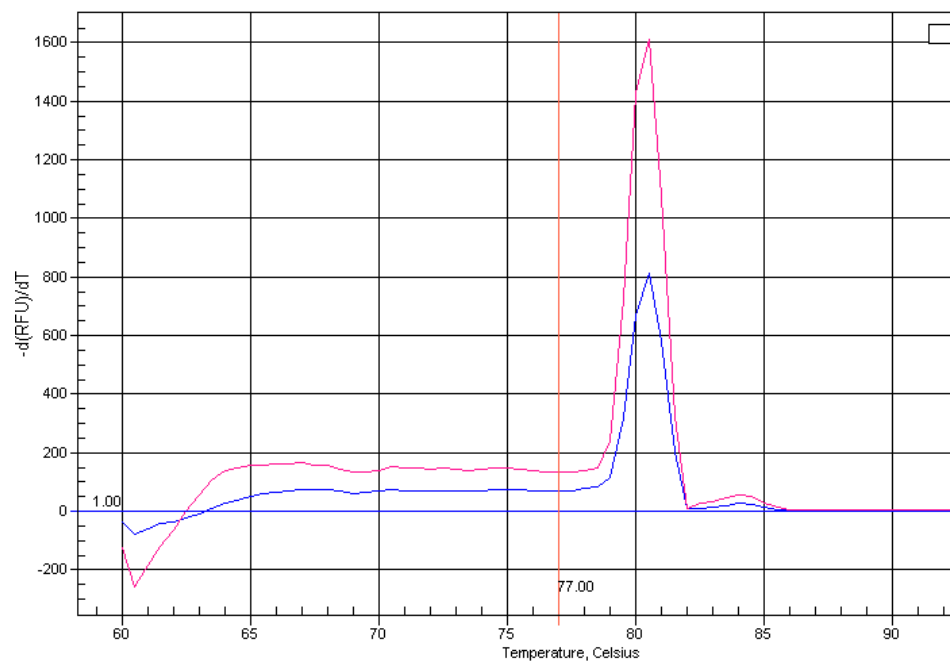
**Kuva A2.** Geenille *atpA* käytetyn alukeparin antaman monistustuotteen sulamiskäyrät. Sinisellä ja punaisella värillä on esitetty rinnakkaisten kaivojen sulamiskäyrät.  $-d(\text{RFU})/dT$  on suhteellisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.



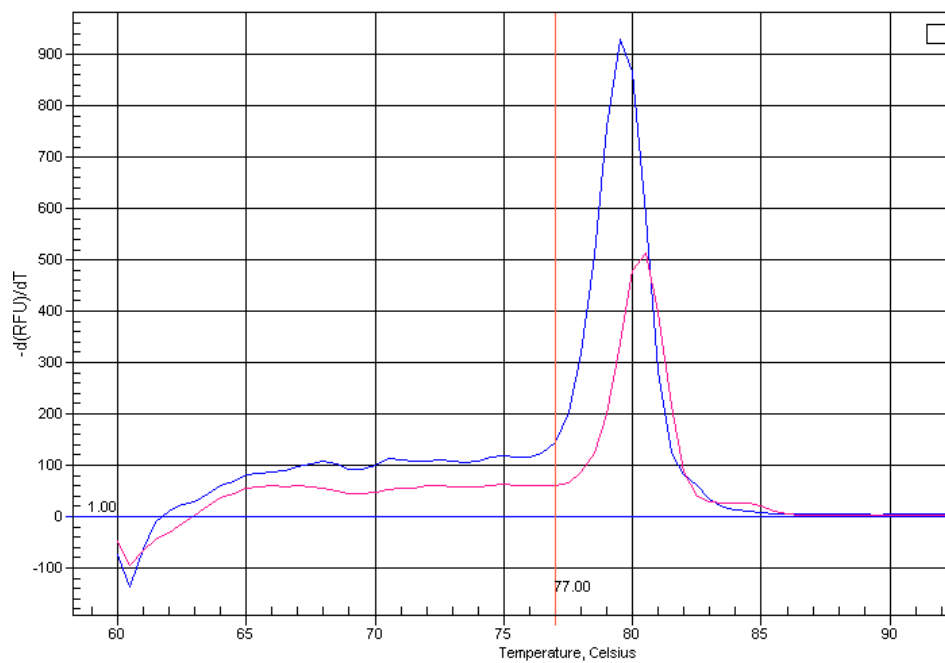
**Kuva A3.** Geenille *cfa* käytetyn alukeparin antaman monistustuotteen sulamiskäyrät. Sinisellä ja punaisella värillä on esitetty rinnakkaisten kaivojen sulamiskäyrät.  $-d(RFU)/dT$  on suhteellisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.



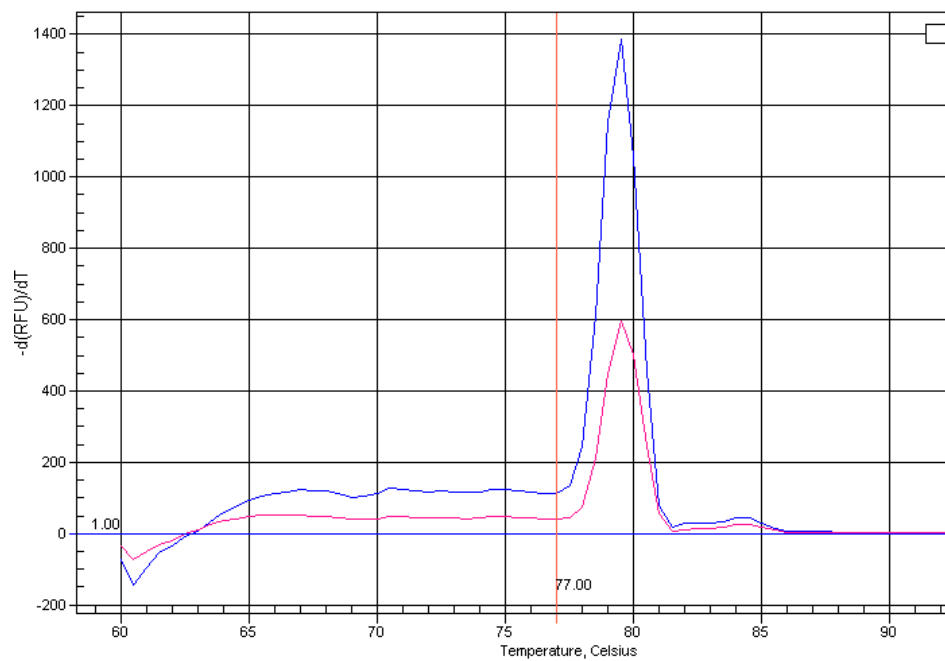
**Kuva A4.** Geenille *groEL* käytetyn alukeparin antaman monistustuotteen sulamiskäyrät. Sinisellä ja punaisella värillä on esitetty rinnakkaisten kaivojen sulamiskäyrät.  $-d(\text{RFU})/dT$  on suhteellisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.



**Kuva A5.** Geenille *hrcA* käytetyn alukeparin antaman monistustuotteen sulamiskäyrät. Sinisellä ja punaisella värillä on esitetty rinnakkaisten kaivojen sulamiskäyrät.  $-d(RFU)/dT$  on suhteellisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.



**Kuva A6.** Geenille *ldhD* käytetyn alukeparin antaman monistustuotteen sulamiskäyrät. Sinisellä ja punaisella värillä on esitetty rinnakkaisten kaivojen sulamiskäyrät.  $-d(\text{RFU})/dT$  on suhteellisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.



**Kuva A7.** Geenille *pstS* käytetyn alukeparin antaman monistustuotteen sulamiskäyrät. Sinisellä ja punaisella värillä on esitetty rinnakkaisten kaivojen sulamiskäyrät.  $-d(RFU)/dT$  on suhteellisen fluoresenssin negatiivinen derivaatta lämpötilan suhteen.



## B Liite: qPCR-data

Taulukoissa B1–B3 ja kuvissa B1– B3 on esitelty qPCR-tulokset. Taulukoissa B1–B3 on esitetty kynnyksen ylittävien syklien arvot kolmena rinnakkaisena näytteenä. Kuvissa B1–B3 on esitetty taulukon arvoista tekstissä esitetyillä yhtälöillä (5, 6 ja 7) lasketut suhteelliset ekspressiot. Jos yksittäinen rinnakkaisen näytteen arvo on poikennut huomattavasti kahdesta muusta, tätä ei ole huomioitu kuvassa. Kuvista pois jätetyt arvot on merkitty taulukoihin keltaisella värillä.

Taulukon B1 ja kuvan B1 kasvuvaiheiden lyhenteet on selitetty kokeellisen osan taulukossa 10. Kuvissa esitetyt vertailupisteseen verratut suhdeluvut on laskettu käyttäen kokeellisen osan yhtälöitä 5-8. Laskuesimerkkinä *pstS*-geenin vertailupisteseen verrattu suhdeluku pisteessä labossta (Huom. Vertailupisteestä jätetty yksi tripletin arvo huomioimatta):

labossta

$$18,66 - 16,91 = 1,75 \quad (\text{B1})$$

$$19,11 - 16,94 = 2,17 \quad (\text{B2})$$

$$18,30 - 17,54 = 0,76 \quad (\text{B3})$$

labrefgal

$$12,22 - 14,34 = -2,12 \quad (\text{B4})$$

$$13,23 - 16,13 = -2,90 \quad (\text{B5})$$

keskiarvot

$$\frac{1}{3} \cdot (1,75 + 2,17 + 0,76) = 1,56 \quad (\text{B6})$$

keskiarvot

$$\frac{1}{2} \cdot (-4,72 - 2,90) = -2,51 \quad (\text{B7})$$

Vertailupisteseen verrattu suhdeluku

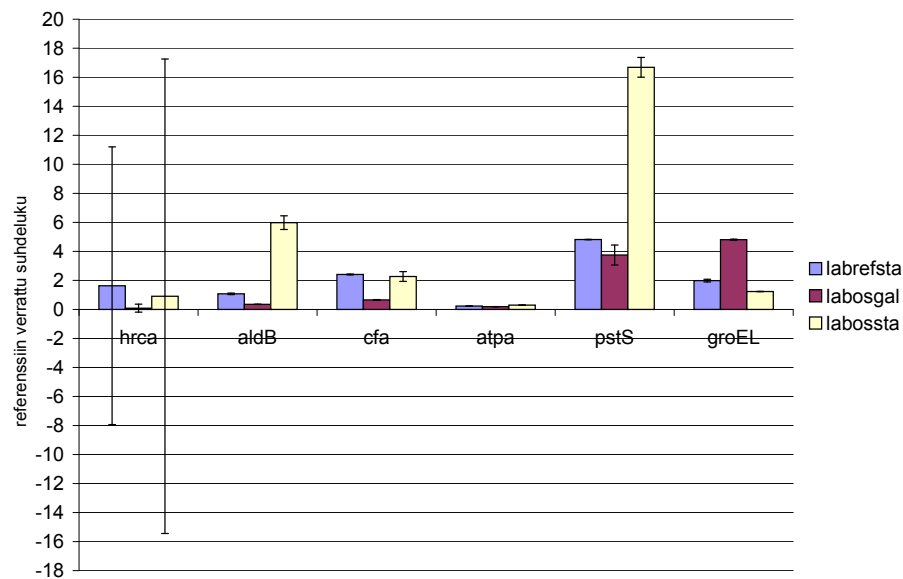
$$\frac{2^{1,56}}{2^{-2,51}} = 16,80 \quad (\text{B8})$$

keskihajonta

$$16,80 \cdot \sqrt{\left( \frac{\sqrt{\frac{(-2,12 - (-2,51))^2 + (-2,90 - (-2,51))^2}{1}}}{(-2,51)^2} \right)^2 \cdot \left( \frac{\sqrt{\frac{(1,75 - 1,56)^2 + (2,17 - 1,56)^2 + (0,76 - 1,56)^2}{2}}}{1,56} \right)^2} = 0,684 \quad (\text{B9})$$

**Taulukko B1.** qPCR:n monistuskynnyksen ylittävien syklien arvot laboratorioravintoalustalla tehdyissä kasvatuksissa.

	labrefgal				labrefsta				labosgal				labossta			
hrca	15.45	11.90	11.78	13.16	14.39	14.77	19.67	16.42	17.31	18.72	17.41	18.99				
aldB	15.75	15.18	14.04	16.59	14.87	16.31	17.10	15.65	16.10	15.55	17.49	17.56				
cfa	16.47	14.77	15.15	16.46	16.18	16.69	17.56	17.45	16.90	18.88	19.55	19.99				
ldhd	15.04	12.22	13.23	15.80	14.05	15.95	14.56	15.55	14.10	18.66	19.11	18.30				
atpa	8.86	5.80	9.98	9.85	11.33	12.00	10.39	12.99	8.97	12.65	14.63	15.10				
pstS	13.82	14.34	16.13	16.04	16.07	16.19	16.51	15.91	13.58	16.91	16.94	17.54				
groEL	9.01	10.21	10.57	10.83	12.67	12.33	12.32	10.65	9.79	16.11	16.71	15.33				



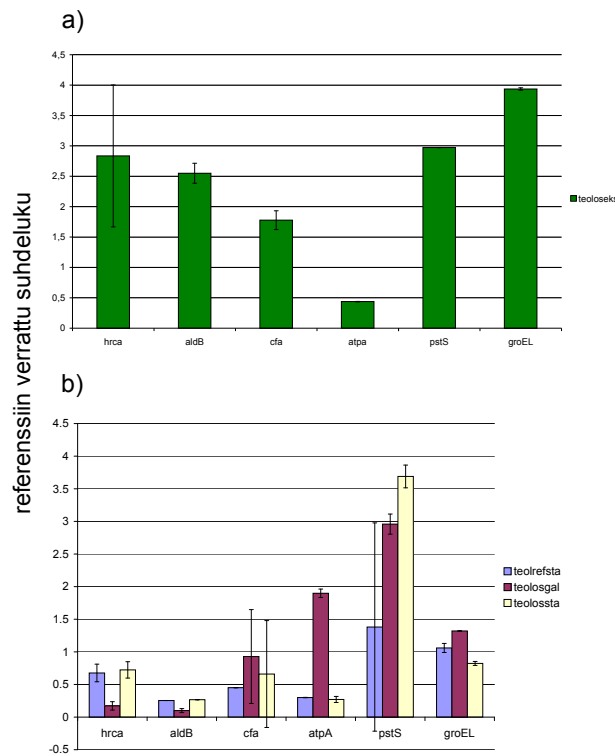
**Kuva B1.** Suhteelliset ekspressiot kasvatuksista laboratorioravintoalustalla qPCR:llä mitattuina. Ekspressiot on esitetty näytepisteeseen labrefgal verrattuina suhdelukuina.

Taulukon B2 ja kuvan B2 kasvuvaiheiden lyhenteet on selitetty kokeellisen osan taulukossa 10.

Taulukossa B3 ja kuvassa B3 KEMO tarkoittaa näytteitä pelkästä kemostaatista, PFR näytteitä bioreaktorin ja tulppavirtausreaktorin yhdistelmästä, NaCl näytteitä NaCl-kokeesta scale-down-kasvatuksissa ja loput näytteet ovat näytteitä numeroaan vastaavasta koesuunnitelman kokeesta. Kuvan B3 ekspressiot on esitetty suhdelukuina näytepisteeseen NaCl verrattuna.

**Taulukko B2.** qPCR:n monistuskynnyksen ylittävien syklien arvot teollisella ravintoalustalla tehdyissä kasvatuksissa.

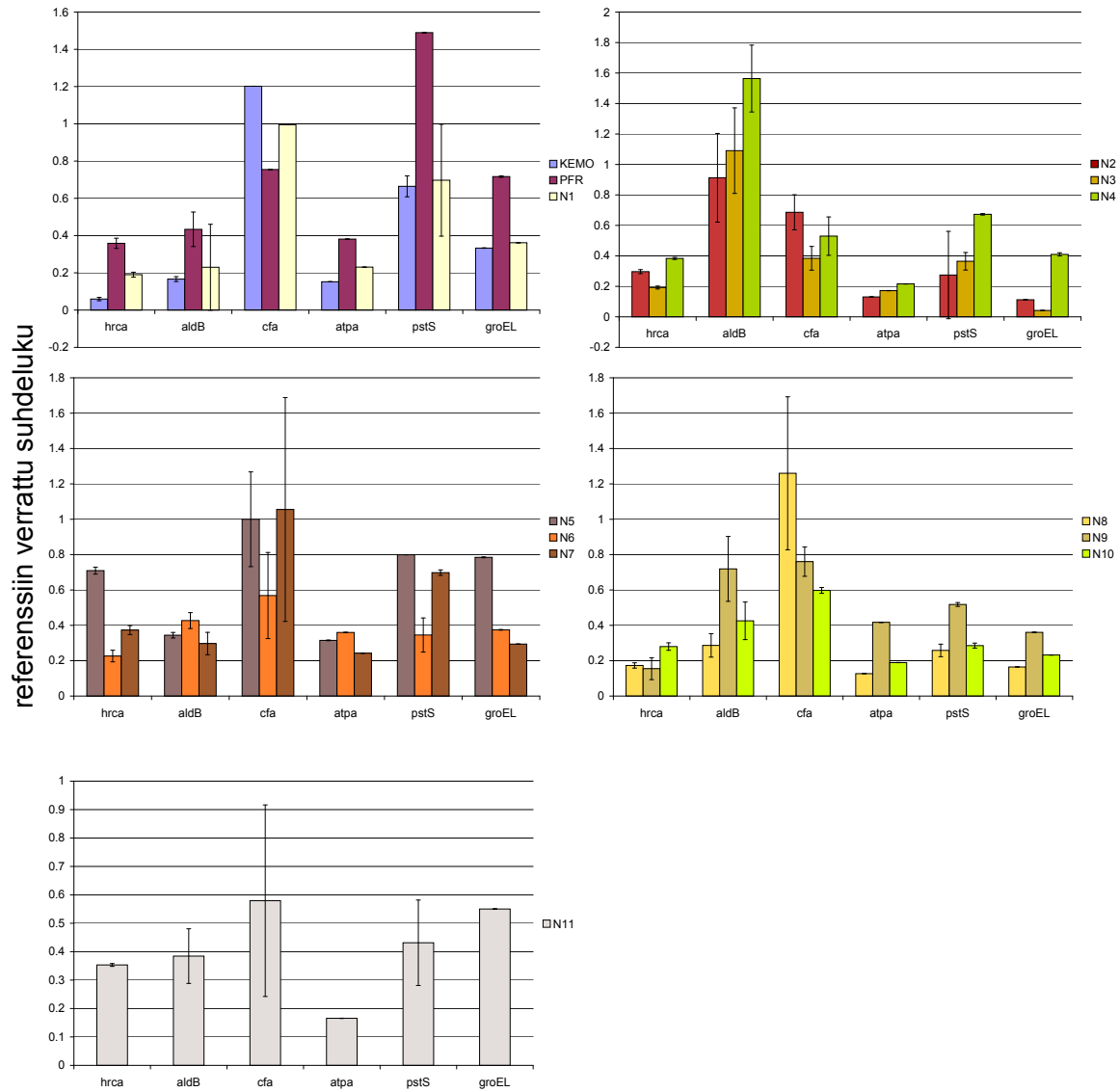
	teolrefeks			teoloseks								
hrca	16.18	16.60	15.91	16.18	14.18	15.92						
aldB	15.20	17.74	14.67	16.74	11.74	14.93						
cfa	17.38	18.82	17.15	17.98	16.93	17.45						
ldhd	15.93	16.87	15.50	17.88	15.18	16.74						
atpa	9.53	8.73	11.58	11.93	11.00	11.99						
pstS	15.93	15.82	16.45	16.51	15.44	14.90						
groEL	10.50	13.38	12.91	11.82	9.71	10.83						
	teolrefgal			teolrefsta			teolosgal			teolossta		
hrca	12.79	14.94	12.11	16.92	16.46	12.23	18.06	13.69	17.80	18.66	16.11	11.89
aldB	15.16	15.98	10.62	17.21	15.20	13.06	16.85	11.98	17.94	17.29	16.80	14.06
cfa	19.04	15.69	13.01	19.22	16.95	14.73	17.39	13.43	13.92	18.46	17.91	13.17
ldhD	18.32	16.16	13.92	17.70	16.48	14.28	17.24	14.61	14.63	18.67	18.06	13.07
atpA	13.02	13.53	12.62	10.94	15.19	12.90	12.63	11.25	10.60	17.28	16.04	12.91
pstS	18.20	15.67	12.98	17.23	18.46	12.78	18.33	12.58	12.50	18.61	15.61	10.72
groEL	11.21	14.16	11.26	13.49	15.92	11.82	15.64	11.93	11.85	17.60	15.34	10.74



**Kuva B2.** Suhteelliset ekspressiot kasvatuksista teollisella ravintoalustalla qPCR:llä mitattuina. a) Näytepisteen teoloseks tutkittujen geenien suhdeluvut pisteeseen teolrefeks nähden. (*pstS*-geenin hajontaa ei ole esitetty kuvassa suuruuden vuoksi. Hajonta on 554,1789.) b) Ekspressioiden suhdeluvut näytepisteeseen teolrefgal verrattuna.

**Taulukko B3.** qPCR:n monistuskynnyksen ylittävien syklien arvot scale-down-kasvatuksen näytteistä.

	NaCl			KEMO			PFR			N1		
hrca	15.11	16.15	16.24	18.74	18.28	16.13	16.99	15.74	16.02	17.01	16.07	17.02
aldB	16.59	18.59	17.06	17.56	16.17	17.89	17.52	15.85	17.49	16.25	17.78	18.19
cfa	19.07	18.80	19.13	16.42	16.52	16.67	18.37	17.90	18.75	16.98	17.74	17.72
ldhd	18.97	18.82	18.72	16.64	15.96	17.32	16.90	18.02	18.39	17.04	17.07	17.81
atpa	10.83	10.36	12.20	10.09	11.95	12.92	11.55	12.26	10.56	10.99	12.18	11.98
pstS	16.91	17.70	18.07	15.86	16.86	16.73	17.80	16.17	16.55	17.01	16.35	16.30
groEL	12.59	13.62	12.67	11.39	11.98	13.69	13.47	12.11	11.54	13.71	12.71	12.27
	NaCl			N2			N3			N4		
hrca	15.46	12.96	14.96	15.89	15.04	14.49	16.39	15.47	16.49	15.75	14.75	16.33
aldB	16.71	16.77	16.80	16.75	15.40	16.57	17.76	15.97	17.10	16.39	17.39	16.77
cfa	19.14	16.89	17.97	17.73	17.59	17.92	18.78	19.52	18.51	20.01	17.66	19.21
ldhd	18.60	17.25	17.57	16.91	16.14	17.15	16.69	16.98	17.59	17.90	17.02	17.80
atpa	8.05	7.78	10.96	9.98	10.68	11.71	10.62	11.86	9.77	10.66	11.00	11.06
pstS	16.71	15.59	17.00	16.15	18.32	16.00	17.31	16.73	16.26	16.81	15.89	16.41
groEL	5.29	10.05	11.20	11.41	9.68	11.70	13.64	12.91	11.57	11.94	12.39	5.37
	NaCl			N5			N6			N7		
hrca	15.35	16.30	16.29	15.95	15.02	15.76	16.60	16.68	16.40	16.84	15.20	14.89
aldB	17.03	18.19	16.98	18.21	16.16	18.11	16.72	15.74	17.10	16.03	17.16	17.35
cfa	19.58	18.78	19.00	18.53	18.08	18.93	18.03	18.36	18.52	17.21	17.32	17.12
ldhd	19.15	18.53	18.79	18.23	16.76	18.77	16.16	17.98	17.64	17.20	17.00	16.99
atpa	11.08	10.44	12.36	10.29	12.83	13.05	11.61	11.75	10.25	11.18	11.88	11.67
pstS	17.25	16.87	18.47	16.76	17.19	17.32	17.45	16.79	16.79	16.52	15.61	15.26
groEL	11.94	12.23	12.90	10.82	10.99	13.59	12.82	11.90	11.90	13.33	12.58	11.18
	NaCl			N8			N9			N10		
hrca	13.76	15.88	15.70	16.02	16.17	16.26	18.42	15.02	18.07	17.15	16.56	15.67
aldB	16.44	17.93	16.69	17.93	16.83	17.23	18.80	16.61	18.04	17.38	18.70	17.96
cfa	21.13	18.96	18.89	17.38	17.62	16.89	18.78	18.67	19.21	19.19	19.75	19.20
ldhd	18.94	18.40	18.26	17.59	16.71	16.82	16.98	18.07	18.66	17.78	18.22	18.13
atpa	10.16	9.88	11.84	11.35	12.79	12.20	10.93	11.95	10.89	11.75	13.43	12.44
pstS	16.76	16.37	17.44	16.74	17.62	16.30	17.06	16.41	16.76	18.19	17.80	17.25
groEL	11.86	11.72	12.37	13.57	13.52	12.20	13.82	11.79	12.87	14.06	14.22	12.52
	NaCl			N11								
hrca	15.42	14.72	15.43	15.43	15.68	15.93						
aldB	16.07	17.11	16.02	16.96	15.66	17.69						
cfa	19.36	17.86	18.58	18.16	18.17	18.82						
ldhd	18.98	17.73	18.26	17.18	16.68	18.07						
atpa	9.32	8.24	11.42	10.13	11.23	12.37						
pstS	16.35	15.95	17.25	16.10	17.05	17.01						
groEL	13.10	12.17	11.75	12.71	10.66	13.19						



**Kuva B3.** Suhteelliset ekspressiot scale-down-kasvatuksen näytteistä qPCR:llä mitattuina. Ekspressiot on esitetty suhdelukuina näytepisteeseen NaCl verrattuna. Huom! *cfa*-geenin hajonnat puuttuvat kuvasta näytepisteiltä KEMO, PFR ja N1 hajontojen suuruuden vuoksi. Hajonnat ovat 60,93, 9,18 ja 21,37.

## C Liite: Näytteiden totaali-RNA:t

Näytteistä määritettiin RNA-pitoisuudet fluorometrisesti (Qubit™ Fluorometer, Invitrogen, USA ja Quant-iT™ RNA Assay Kit, Invitrogen, USA). Tulokset on esitetty taulukossa C1. Panoskasvatusten kasvuvaiheiden lyhenteet on selitetty kokeellisen osan taulukossa 10. Scale-down-kokeiden lyhenteistä KEMO tarkoittaa näytteitä pelkästä kemostaatista, PFR näytteitä bioreaktorin ja tulppavirtausreaktorin yhdistelmästä, NaCl näytteitä NaCl-kokeesta scale-down-kasvatuksesta, ja loput näytteet ovat näytteitä numeroaan vastaavasta koesuunnitelman kokeesta.

**Taulukko C1.** Näytteistä eristetyt totaali-RNA:n määrät.

	RNA (ug)		RNA (ug)		RNA (ug)
labrefgal	56.00	NaCl	8.57	N8	5.08
labrefgal	(>80.00)	NaCl	9.32	N8	5.98
labrefgal	36.75	NaCl	7.45	N8	9.13
labrefsta	12.70	NaCl	5.64	N9	4.32
labrefsta	13.30	NaCl	8.76	N9	4.13
labrefsta	93.25	NaCl	4.90	N9	3.22
laboseks	72.60	NaCl	13.10	N10	3.16
laboseks	34.00	NaCl	13.70	N10	3.20
laboseks	31.50	NaCl	8.71	N10	4.45
labosgal	61.00	NaCl	13.60	N11	2.95
labosgal	30.70	NaCl	13.50	N11	3.96
labosgal	132.00	NaCl	8.09	N11	2.52
labossta	61.00	NaCl	12.10		
labossta	36.40	NaCl	16.30		
labossta	35.30	NaCl	13.30		
teolrefeks	50.00	KEMO	9.87		
teolrefeks	62.00	KEMO	8.88		
teolrefeks	54.25	KEMO	5.10		
teolrefgal	11.20	PFR	7.39		
teolrefgal	4.55	PFR	9.65		
teolrefgal	4.48	PFR	7.70		
teolrefsta	9.62	N1	22.10		
teolrefsta	7.90	N1	9.88		
teolrefsta	2.37	N1	11.20		
teoloseks	14.70	N2	11.00		
teoloseks	61.00	N2	7.82		
teoloseks	79.75	N2	10.10		
teolosgal	2.10	N3	5.07		
teolosgal	13.70	N3	6.62		
teolosgal	18.25	N3	6.49		
teolossta	1.20	N4	16.30		
teolossta	68.70	N4	12.80		
teolossta	3.60	N4	8.89		
R	11.60	N5	11.10		
R	14.70	N5	11.70		
R	13.00	N5	8.00		
R30	6.57	N6	13.10		
R30	5.03	N6	8.38		
R30	7.04	N6	8.01		
A30	49.20	N7	11.30		
A30	29.20	N7	13.30		
A30	44.00	N7	12.10		

## D Liite: TRAC-data

Taulukoissa D1–D3 on esitelty TRAC-tulokset. Taulukon D1 kasvuvaiheiden lyhenteet on selitetty kokeellisen osan taulukossa 10.

**Taulukko D1.** TRAC:in kapillaarielektroforeesipiikkien pinta-alaa kuvaavat arvot eri geeneille laboratorioravintoalustalla tehdyissä kasvatuksissa. Keltaisella pohjalla olevat arvot on myös esitetty kokeellisen osan kuvassa 17.

	labrefgal	labrefgal	labrefgal	labrefsta	labrefsta	labrefsta	labosgal	labosgal	labosgal	labossta	labossta	labossta
ldhD	10399	13592	11988	6220	2287	4676	10017	6602	3823	1091	900	706
pstS	3253	3856	3903	3195	2082	3105	3136	1967	1877	1575	1440	1013
atpA	21297	39758	25737	9374	8645	15739	14702	11076	6025	3523	3168	2238
hrcA	9003	11467	10482	5154	3931	7946	10175	6563	4337	3789	2803	2223
aldB	4159	6178	4388	2533	2151	3641	5154	3399	2290	1933	1756	1395
cfa	4190	6441	4751	2898	2894	3036	4380	2807	2021	1070	929	716
groEL	23709	34223	27538	11233	8028	18733	32675	25239	14507	8283	6758	5146
	labosgal, RNA- näyte	labosgal, RNA- näyte										
ldhD	5246	8226										
pstS	1370	2118										
atpA	7606	11895										
hrcA	5448	8345										
aldB	2855	4088										
cfa	2165	3281										
groEL	23254	35743										

Taulukon D2 kasvuvaiheiden lyhenteet on selitetty kokeellisen osan taulukossa 10.

**Taulukko D2.** TRAC:in kapillaarielektroforeesipiikkien pinta-alaa kuvaavat arvot eri geeneille teollisella ravintoalustalla tehdyissä kasvatuksissa.

	teolrefeks	teolrefeks	teolrefeks	teolrefgal	teolrefgal	teolrefgal	teolrefsta	teolrefsta	teolrefsta
ldhD	5387	2665	4083	1370	1189	1130	1459	1018	1004
pstS	7638	3009	2805	1477	1797	1553	2444	1327	1106
atpA	16191	9163	17874	3499	2691	2246	4087	3134	4315
hrcA	8664	3987	7282	9746	6827	6342	3623	2704	2828
aldB	6002	3541	6605	4605	2914	2829	2454	2156	2304
cfa	4229	2330	3490	2284	1643	1511	1479	997	947
groEL	24969	14822	29366	29510	18392	18741	8322	8547	8669
	teoloseks	teoloseks	teoloseks	teolosgal	teolosgal	teolosgal	teolossta	teolossta	teolossta
ldhD	3937	3385	4606	3865	1706	3891	798	588	718
pstS	3624	3511	4223	3766	1677	3588	1271	909	1144
atpA	15190	12631	17892	16482	7405	16639	2087	1539	1928
hrcA	12349	9839	15290	7776	3729	7916	5927	4879	5084
aldB	13582	10808	15455	8753	4167	8942	2291	1807	2010
cfa	3875	3386	4573	5611	3182	5799	1345	953	1095
groEL	60267	46659	67443	24154	12417	25646	11847	10640	9812

Taulukossa D3 KEMO tarkoittaa näytteitä pelkästä kemostaatista, PFR näytteitä bioreaktorin ja tulppavirtausreaktorin yhdistelmästä, NaCl näytteitä NaCl-kokeesta scale-down-kasvatuksesta ja loput näytteet ovat näytteitä numeroaan vastaavasta koesuunnitelman kokeesta.

**Taulukko D3.** TRAC:in kapillaarielektroforeesipiikkien pinta-alaa kuvaavat arvot eri geeneille scale-down-kasvatuksen näytteistä. Keltaisella värillä on merkitty malleista pois jätetyt mittaussäilykkeet.

	KEMO	KEMO	KEMO	PFR	PFR	PFR	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl	NaCl
ldhD	1734	1327	1316	588	802	1107	500	487	574	473	458	677
pstS	1956	1870	1735	783	1179	1461	1042	909	1050	950	782	1159
atpA	19430	12144	10712	5120	5984	11212	9604	9766	7592	9599	7553	9148
hrcA	5595	4177	4329	2919	3366	6162	5098	4500	3479	4334	3790	4979
aldB	1857	1818	1811	1241	1565	2033	1356	1318	1135	1288	1253	1542
cfa	4143	3043	3132	1085	1311	1899	1153	1186	1208	1101	1128	1561
groEL	18852	14325	14687	9719	10368	18843	16678	14961	10342	13432	12265	13546
	NaCl, RNA- näyte	NaCl, RNA- näyte	NaCl, RNA- näyte	N1	N1	N1	N2	N2	N2	N3	N3	N3
ldhD	258	315	322	677	1182	963	954	1120	1024	974	890	708
pstS	466	552	463	1346	1657	1339	1064	1177	1086	1358	1316	1006
atpA	6987	8332	6594	16639	9512	8941	9771	10206	8820	8802	7522	6774
hrcA	3080	3432	2919	4229	4247	3901	5183	6077	5573	6372	4708	4395
aldB	822	929	664	1777	1578	1536	1958	2095	1986	2107	1862	1509
cfa	455	585	415	2014	1909	1764	1686	1863	1617	1585	1640	1192
groEL	10427	12000	10402	11006	11303	11600	14236	17077	19054	18888	12743	12163
	N4	N4	N4	N5	N5	N5	N6	N6	N6	N7	N7	N7
ldhD	541	709	1064	563	1035	950	999	881	883	1524	1785	2070
pstS	901	1185	1897	1318	2588	2274	1297	1143	1013	2576	2958	3246
atpA	4285	6779	13805	5258	9154	8399	12407	9480	10545	11449	12399	13505
hrcA	2413	4119	6169	4305	6997	6214	5635	4594	4715	5544	6411	7985
aldB	1043	1641	2389	1427	2383	2137	2632	2235	2188	2958	3544	3650
cfa	867	1317	1585	1145	1810	1690	1947	1677	1656	2478	2781	3258
groEL	6476	11095	16073	12466	20685	17713	18292	14285	14982	16528	18766	23570
	N8	N8	N8	N9	N9	N9	N10	N10	N10	N11	N11	N11
ldhD	2933	3177	2701	1416	1158	1414	1712	907	945	1138	881	1019
pstS	3085	3296	2825	2710	1994	2859	2469	1371	1453	2064	1863	1788
atpA	20444	23729	19559	17737	13404	14703	17769	9063	10321	11756	11595	10907
hrcA	9742	9800	8892	7700	5613	7345	10798	6084	6023	7474	7003	6279
aldB	4650	5020	4045	2730	2232	2668	3710	2109	2185	2695	2225	2162
cfa	5036	4825	4623	2278	1821	2307	2133	1246	1320	1503	1242	1449
groEL	30998	28130	25465	24791	18426	25431	33129	18625	17569	22692	21317	17058



## E Liite: Mallien generointi ja niiden $R^2$ - ja $Q^2$ -arvot

```
function models
% Tässä sovitaan geeniekspressiodata lämpötilan ja pH:n suhteen
% erilaisiin regressiomallirakenteisiin. Malleista kerätään parametrit ja
% niiden hyvyttä kuvaavat  $R^2$ - ja  $Q^2$ -arvot.
% Geenien ekspressiot luetaan excel-tiedostosta, jossa data on siten
% että ensimmäisessä sarakkeessa on ekspresiodata, toisessa lämpötila
%  $1/\ln(T)$  ja kolmannessa pH:n muutos. Kunkin geenin data on omalla
% lehdykällään
pstS=xlsread('data.xls','pstS');
atpA=xlsread('data.xls','atpA');
hrcA=xlsread('data.xls','hrcA');
aldB=xlsread('data.xls','aldB');
cfa=xlsread('data.xls','cfa');
groEL=xlsread('data.xls','groEL');
%luodaan matriisit mallien regressiokertoimia varten
%järjestys: vakiotermi dpH dpH^2 T T^2 dpHT vaakatasossa
pstS_reg=zeros(9,6);
atpA_reg=zeros(9,6);
hrcA_reg=zeros(9,6);
aldB_reg=zeros(9,6);
cfa_reg=zeros(9,6);
groEL_reg=zeros(9,6);
%luodaan matriisi, johon kerätään mallien  $R^2$ -arvot
%järjestys pstS atpA hrcA aldB cfa groEL vaakatasossa
R2=zeros(9,6);
%luodaan matriisi, johon kerätään mallien  $Q^2$ -arvot
%järjestys pstS atpA hrcA aldB cfa groEL vaakatasossa
Q2=zeros(9,6);

%1. malli (dpH)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(1,1:2)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(1,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(1,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(1,1:2)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(1,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(1,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(1,1:2)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(1,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(1,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
```

```

%aldB
y=aldB(1:end,1);
T=aldB(1:end,2);
ph=aldB(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldB_reg(1,1:2)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(1,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(1,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(1,1:2)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(1,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(1,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
groEL_reg(1,1:2)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(1,6)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(1,6)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%2. malli (pH,pH^2)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(2,1:3)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(2,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(2,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(2,1:3)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(2,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');

```

```

PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(2,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(2,1:3)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(2,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(2,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%aldB
y=aldB(1:end,1);
T=aldB(1:end,2);
ph=aldB(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldB_reg(2,1:3)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(2,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(2,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(2,1:3)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(2,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(2,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
groEL_reg(2,1:3)=b;
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(2,6)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(2,6)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%3. malli (T)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(3,1)=b(1);

```

```

pstS_reg(3,4)=b(2);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(3,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(3,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(3,1)=b(1);
atpA_reg(3,4)=b(2);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(3,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(3,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(3,1)=b(1);
hrcA_reg(3,4)=b(2);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(3,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(3,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%aldB
y=aldB(1:end,1);
T=aldB(1:end,2);
ph=aldB(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldB_reg(3,1)=b(1);
aldB_reg(3,4)=b(2);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(3,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(3,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(3,1)=b(1);
cfa_reg(3,4)=b(2);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(3,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(3,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);

```

```

end
b=inv(X'*X)*X'*y;
groEL_reg(3,1)=b(1);
groEL_reg(3,4)=b(2);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(3,6)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(3,6)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%4. malli (T,T^2)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
    X(i,3)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(4,1)=b(1);
pstS_reg(4,4:5)=b(2:3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(4,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(4,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
    X(i,3)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(4,1)=b(1);
atpA_reg(4,4:5)=b(2:3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(4,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(4,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
    X(i,3)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(4,1)=b(1);
hrcA_reg(4,4:5)=b(2:3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(4,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(4,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%aldB
y=aldB(1:end,1);
T=aldB(1:end,2);
ph=aldB(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
    X(i,3)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldB_reg(4,1)=b(1);
aldB_reg(4,4:5)=b(2:3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(4,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');

```

```

PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(4,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
    X(i,3)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(4,1)=b(1);
cfa_reg(4,4:5)=b(2:3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(4,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(4,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= T(i);
    X(i,3)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
groEL_reg(4,1)=b(1);
groEL_reg(4,4:5)=b(2:3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(4,6)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(4,6)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%5. malli (dph,T)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(5,1:2)=b(1:2);
pstS_reg(5,4)=b(3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(5,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(5,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(5,1:2)=b(1:2);
atpA_reg(5,4)=b(3);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(5,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(5,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;

```

```

        X(i,2)= ph(i);
        X(i,3)= T(i);
    end
    b=inv(X'*X)*X'*y;
    hrcA_reg(5,1:2)=b(1:2);
    hrcA_reg(5,4)=b(3);
    ypred=X*b;
    SSE=sum((y-ypred).^2);
    SST=sum((y-mean(y)).^2);
    R2(5,3)=1-SSE/SST;
    h=diag(X*inv(X'*X)*X');
    PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
    Q2(5,3)=1-PRESS/SST;
    clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
    %aldB
    y=aldB(1:end,1);
    T=aldB(1:end,2);
    ph=aldB(1:end,3);
    for i=1:length(y),
        X(i,1)= 1;
        X(i,2)= ph(i);
        X(i,3)= T(i);
    end
    b=inv(X'*X)*X'*y;
    aldB_reg(5,1:2)=b(1:2);
    aldB_reg(5,4)=b(3);
    ypred=X*b;
    SSE=sum((y-ypred).^2);
    SST=sum((y-mean(y)).^2);
    R2(5,4)=1-SSE/SST;
    h=diag(X*inv(X'*X)*X');
    PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
    Q2(5,4)=1-PRESS/SST;
    clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
    %cfa
    y=cfa(1:end,1);
    T=cfa(1:end,2);
    ph=cfa(1:end,3);
    for i=1:length(y),
        X(i,1)= 1;
        X(i,2)= ph(i);
        X(i,3)= T(i);
    end
    b=inv(X'*X)*X'*y;
    cfa_reg(5,1:2)=b(1:2);
    cfa_reg(5,4)=b(3);
    ypred=X*b;
    SSE=sum((y-ypred).^2);
    SST=sum((y-mean(y)).^2);
    R2(5,5)=1-SSE/SST;
    h=diag(X*inv(X'*X)*X');
    PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
    Q2(5,5)=1-PRESS/SST;
    clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
    %groEL
    y=groEL(1:end,1);
    T=groEL(1:end,2);
    ph=groEL(1:end,3);
    for i=1:length(y),
        X(i,1)= 1;
        X(i,2)= ph(i);
        X(i,3)= T(i);
    end
    b=inv(X'*X)*X'*y;
    groEL_reg(5,1:2)=b(1:2);
    groEL_reg(5,4)=b(3);
    ypred=X*b;
    SSE=sum((y-ypred).^2);
    SST=sum((y-mean(y)).^2);
    R2(5,6)=1-SSE/SST;
    h=diag(X*inv(X'*X)*X');
    PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
    Q2(5,6)=1-PRESS/SST;
    clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

    %6. malli (dph,dph^2,T)

    %pstS
    y=pstS(1:end,1);
    T=pstS(1:end,2);
    ph=pstS(1:end,3);
    for i=1:length(y),
        X(i,1)= 1;
        X(i,2)= ph(i);
        X(i,3)= ph(i).^2;
        X(i,4)= T(i);
    end
    b=inv(X'*X)*X'*y;
    pstS_reg(6,1:4)=b(1:4);
    ypred=X*b;
    SSE=sum((y-ypred).^2);
    SST=sum((y-mean(y)).^2);

```

```

R2(6,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(6,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(6,1:4)=b(1:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(6,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(6,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(6,1:4)=b(1:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(6,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(6,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%aldB
y=aldB(1:end,1);
T=aldB(1:end,2);
ph=aldB(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldB_reg(6,1:4)=b(1:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(6,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(6,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(6,1:4)=b(1:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(6,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(6,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);

```



```

        X(i,3)= ph(i).^2;
        X(i,4)= T(i);
    end
    b=inv(X'*X)*X'*y;
    groEL_reg(6,1:4)=b(1:4);
    ypred=X*b;
    SSE=sum((y-ypred).^2);
    SST=sum((y-mean(y)).^2);
    R2(6,6)=1-SSE/SST;
    h=diag(X*inv(X'*X)*X');
    PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
    Q2(6,6)=1-PRESS/SST;
    clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%7. malli (dph,T,T^2)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(7,1:2)=b(1:2);
pstS_reg(7,4:5)=b(3:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(7,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(7,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(7,1:2)=b(1:2);
atpA_reg(7,4:5)=b(3:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(7,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(7,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(7,1:2)=b(1:2);
hrcA_reg(7,4:5)=b(3:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(7,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(7,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%aldB
y=aldB(1:end,1);
T=aldB(1:end,2);
ph=aldB(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldB_reg(7,1:2)=b(1:2);
aldB_reg(7,4:5)=b(3:4);

```

```

ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(7,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(7,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(7,1:2)=b(1:2);
cfa_reg(7,4:5)=b(3:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(7,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(7,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i).^2;
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
groEL_reg(7,1:2)=b(1:2);
groEL_reg(7,4:5)=b(3:4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(7,6)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(7,6)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%8. malli (dph,T,dphT)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(8,1:2)=b(1:2);
pstS_reg(8,4)=b(3);
pstS_reg(8,6)=b(4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(8,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(8,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(8,1:2)=b(1:2);
atpA_reg(8,4)=b(3);
atpA_reg(8,6)=b(4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);

```

```

R2(8,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(8,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(8,1:2)=b(1:2);
hrcA_reg(8,4)=b(3);
hrcA_reg(8,6)=b(4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(8,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(8,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%aldb
y=aldb(1:end,1);
T=aldb(1:end,2);
ph=aldb(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldb_reg(8,1:2)=b(1:2);
aldb_reg(8,4)=b(3);
aldb_reg(8,6)=b(4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(8,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(8,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(8,1:2)=b(1:2);
cfa_reg(8,4)=b(3);
cfa_reg(8,6)=b(4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(8,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(8,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= T(i);
    X(i,4)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
groEL_reg(8,1:2)=b(1:2);
groEL_reg(8,4)=b(3);
groEL_reg(8,6)=b(4);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(8,6)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(8,6)=1-PRESS/SST;

```

```

clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%9. mali (dph,dph^2,T,T^2,dphT)

%pstS
y=pstS(1:end,1);
T=pstS(1:end,2);
ph=pstS(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
    X(i,5)= T(i).^2;
    X(i,6)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
pstS_reg(9,1:6)=b(1:6);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(9,1)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(9,1)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%atpA
y=atpA(1:end,1);
T=atpA(1:end,2);
ph=atpA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
    X(i,5)= T(i).^2;
    X(i,6)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
atpA_reg(9,1:6)=b(1:6);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(9,2)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(9,2)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%hrcA
y=hrcA(1:end,1);
T=hrcA(1:end,2);
ph=hrcA(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
    X(i,5)= T(i).^2;
    X(i,6)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
hrcA_reg(9,1:6)=b(1:6);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(9,3)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(9,3)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

%aldB
y=aldB(1:end,1);
T=aldB(1:end,2);
ph=aldB(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
    X(i,5)= T(i).^2;
    X(i,6)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
aldB_reg(9,1:6)=b(1:6);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(9,4)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(9,4)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

```

```

%cfa
y=cfa(1:end,1);
T=cfa(1:end,2);
ph=cfa(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
    X(i,5)= T(i).^2;
    X(i,6)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
cfa_reg(9,1:6)=b(1:6);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(9,5)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(9,5)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS
%groEL
y=groEL(1:end,1);
T=groEL(1:end,2);
ph=groEL(1:end,3);
for i=1:length(y),
    X(i,1)= 1;
    X(i,2)= ph(i);
    X(i,3)= ph(i).^2;
    X(i,4)= T(i);
    X(i,5)= T(i).^2;
    X(i,6)= T(i)*ph(i);
end
b=inv(X'*X)*X'*y;
groEL_reg(9,1:6)=b(1:6);
ypred=X*b;
SSE=sum((y-ypred).^2);
SST=sum((y-mean(y)).^2);
R2(9,6)=1-SSE/SST;
h=diag(X*inv(X'*X)*X');
PRESS=sum((y-ypred).^2./(1-h).^2);
Q2(9,6)=1-PRESS/SST;
clear y ph T X b ypred SSE SST h PRESS

R2
Q2

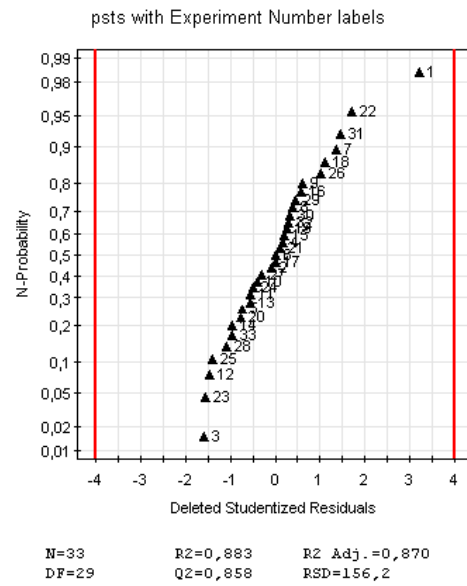
```

## F Liite: Mallien tunnusluvut

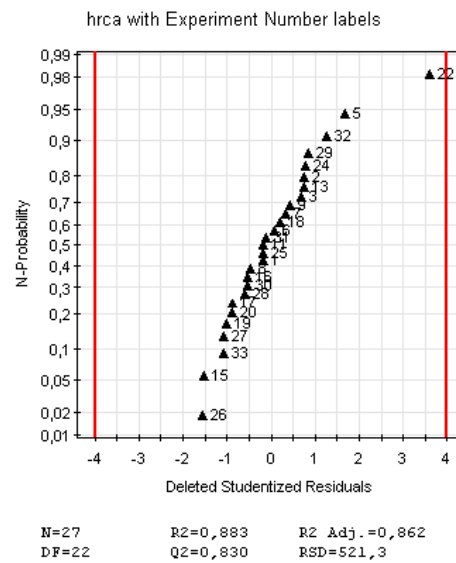
Tässä liitteessä on esitetty *pstS*-, *hrcA*-, *groEL* ja *atpA*-geenien ekspressiomallien tunnusluvut ja residuaalien normaaliJakautuneisuus. Mallien tunnusluvut ja residuaalien normaaliJakautuneisuus määritettiin Modde-ohjelmalla (Modde 8.0.0.0, Umetrics AB). Tunnusluvut malleille on esitetty taulukoissa F1, F2, F3 ja F4. Residuaalien normaaliJakautuneisuus on esitetty kuvissa F1, F2, F3 ja F4.

**Taulukko F1.** *pstS*-geenin ekspressiomallin tunnusluvut.

psts	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD	
Total	33	1,02602e+008	3,10915e+006				
Constant	1	9,65795e+007	9,65795e+007				
Total Corrected	32	6,02238e+006	188200			433,82	
Regression	3	5,31513e+006	1,77171e+006	72,6466	<b>0,000</b>	1331,06	
Residual	29	707254	24388,1			156,167	
Lack of Fit	7	225966	32280,8	1,47558	<b>0,227</b>	179,669	
(Model Error)							
Pure Error (Replicate Error)	22	481288	21876,7			147,908	
	N = 33	Q2 = 0,858		Cond. no. = 7,713			
	DF = 29	R2 = 0,883		Y-miss = 0			
		R2 Adj. = 0,870		RSD = 156,2			
psts	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)		psts	Coeff.
Constant	1725,13	40,9592	1,45653e-027	83,7721		Constant	1216,01
dpH	195,778	116,166	0,102658	237,59		dpH	3066,28
dpH*dpH	178,457	79,6875	0,0329604	162,981		dpH*dpH	-6970,03
dpH*dpH*dpH	625,988	152,496	0,000300639	311,893		dpH*dpH*dpH	6029,38
	N = 33	Q2 = 0,858		Cond. no. = 7,713			
	DF = 29	R2 = 0,883		Y-miss = 0			
		R2 Adj. = 0,870		RSD = 156,2			
				Conf. lev. = 0,95			



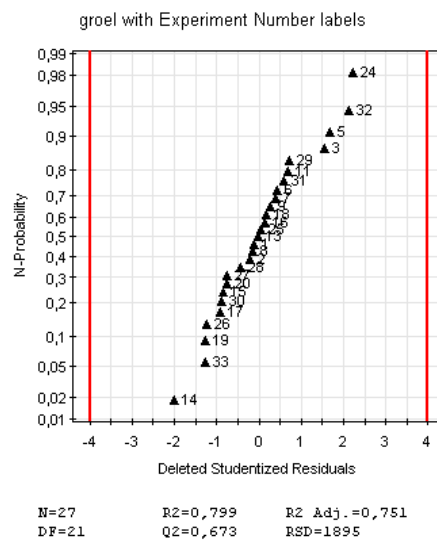
Kuva F1. *pstS*-geenin ekspressiomallin residuaalien normaalijakautuneisuus.



Kuva F2. *hrcA*-geenin ekspressiomallin residuaalien normaalijakautuneisuus.

Taulukko F2. *hrcA*-geenin ekspressiomallin tunnusluvut.

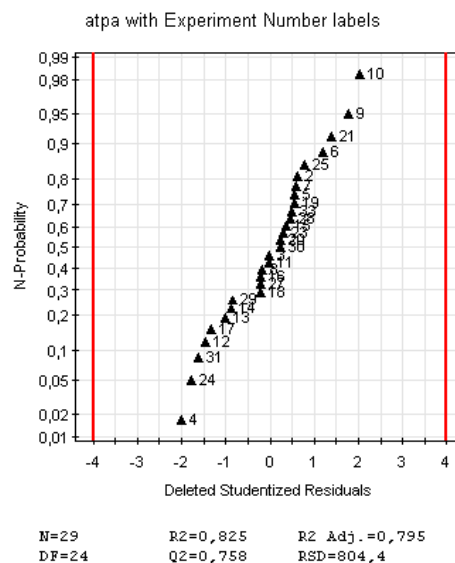
hrca	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	27	9,89E+08	3,66E+07			
Constant	1	9,38E+08	9,38E+08			
Total Corrected	26	5,11E+07	1,96E+06			1401,63
Regression	4	4,51E+07	1,13E+07	41,4877	0	3357,81
Residual	22	5,98E+06	271765			521,311
Lack of Fit (Model Error)	6	2,67E+06	444724	2,14941	0,104	666,876
Pure Error (Replicate Error)	16	3,31E+06	206905			454,868
	N = 27	Q2 =	0,83	Cond. no. =	1335	
	DF = 22	R2 =	0,883	Y-miss =	0	
		R2 Adj. =	0,862	RSD =	521,3	
hrca	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)	hrca	Coeff.
Constant	250,245	826,796	0,764986	1714,68	Constant	-673068224
dpH	979,842	160,172	3,71E-06	332,177	dpH	4025,12671
T	-123345	20679,2	5,29E-06	42886,2	T	7716864512
dpH*dpH	-498,401	302,053	0,113141	626,423	dpH*dpH	-2256,22949
T*T	-552967	116358	9,61E-05	241313	T*T	-22118666240
	N = 27	Q2 =	0,83	Cond. no. =	1335	
	DF = 22	R2 =	0,883	Y-miss =	0	
		R2 Adj. =	0,862	RSD =	521,3	
			Conf. lev. =	0,95		

Kuva F3. *groEL*-geenin ekspressiomallin residuaalien normaali-jakautuneisuus.



Taulukko F3. *groEL*-geenin ekspressiomallin tunnusluvut.

groel	DF	SS	MS (variance)	F	p	SD
Total	27	8,26E+09	3,06E+08			
Constant	1	7,88E+09	7,88E+09			
Total Corrected	26	3,75E+08	1,44E+07			3799,86
Regression	5	3,00E+08	6,00E+07	16,7067	<b>0</b>	7745,9
Residual	21	7,54E+07	3,59E+06			1895,07
Lack of Fit (Model Error)	5	2,96E+07	5,92E+06	2,0702	<b>0,123</b>	2434,13
Pure Error (Replicate Error)	16	4,58E+07	2,86E+06			1691,75
	N = 27	Q2 =	0,673	Cond. no. =	1471	
	DF = 21	R2 =	0,799	Y-miss =	0	
		R2 Adj. =	0,751	RSD =	1895	
groel	Coeff. SC	Std. Err.	P	Conf. int(±)	groel	Coeff.
Constant	7143,93	3337,87	0,0442284	6941,5	Constant	-911934592
dpH	8926,91	2383,33	0,00119179	4956,41	dpH	-4884583,5
T	-186087	85101,3	0,0402287	176978	T	10471363584
dpH*dpH	2075,43	1315,07	0,129465	2734,84	dpH*dpH	9395,3584
T*T	-751473	466159	0,121878	969433	T*T	-30058883072
dpH*T	65739,6	24372,1	0,0134894	50684,6	dpH*T	27974266
	N = 27	Q2 =	0,673	Cond. no. =	1471	
	DF = 21	R2 =	0,799	Y-miss =	0	
		R2 Adj. =	0,751	RSD =	1895	
			Conf. lev. =	0,95		

Kuva F4. *atpA*-geenin ekspressiomallin residuaalien normaalijakautuneisuus.

Taulukko F4. *atpA*-geenin ekspressiomallin tunnusluvut.

<b>atpa</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS (variance)</b>	<b>F</b>	<b>p</b>	<b>SD</b>	
Total	29	3,03E+09	1,05E+08				
Constant	1	2,94E+09	2,94E+09				
Total Corrected	28	8,85E+07	3,16E+06			1777,95	
Regression	4	7,30E+07	1,82E+07	28,1949	<b>0</b>	4271,44	
Residual	24	1,55E+07	647108			804,43	
Lack of Fit (Model Error)	6	5,32E+06	886032	1,56138	<b>0,215</b>	941,293	
Pure Error (Replicate Error)	18	1,02E+07	567467			753,304	
	N = 29	Q2 =	0,758	Cond. no. =	70,12		
	DF = 24	R2 =	0,825	Y-miss =	0		
		R2 Adj. =	0,795	RSD =	804,4		
<b>atpa</b>	<b>Coeff. SC</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>P</b>	<b>Conf. int(±)</b>		<b>atpa</b>	<b>Coeff.</b>
<b>Constant</b>	9360,9	494,065	6,09E-16	1019,69		<b>Constant</b>	3045742,25
<b>dpH</b>	8875,76	901,759	6,69E-10	1861,12		<b>dpH</b>	-6698168,5
<b>T</b>	-4511,67	5063,79	<b>0,381792</b>	10451		<b>T</b>	-17387210
<b>dpH*dpH</b>	2078,84	483,668	0,00024751	998,229		<b>dpH*dpH</b>	9410,79004
<b>dpH*T</b>	90091,4	9199,34	7,38E-10	18986,3		<b>dpH*T</b>	38336912
	N = 29	Q2 =	0,758	Cond. no. =	70,12		
	DF = 24	R2 =	0,825	Y-miss =	0		
		R2 Adj. =	0,795	RSD =	804,4		
				Conf. lev. =	0,95		